



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**ASPECTOS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DA ADESÃO
MICROBIANA E MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DA
HIGIENIZAÇÃO *CLEAN IN PLACE* UTILIZANDO FLUXO PULSADO**

LUCAS DONIZETE SILVA

UBERLÂNDIA – MG

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ASPECTOS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DA ADESÃO
MICROBIANA E MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DA HIGIENIZAÇÃO
CLEAN IN PLACE UTILIZANDO FLUXO PULSADO**

Lucas Donizete Silva

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho

Co-orientadores: Rubens Gedraite

Emiliane Andrade Araújo Naves

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

UBERLÂNDIA – MG

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S586a
2023
- Silva, Lucas Donizete, 1995-
Aspectos cinéticos e termodinâmicos da adesão microbiana e modelagem e otimização da higienização Clean in Place utilizando fluxo pulsado [recurso eletrônico] / Lucas Donizete Silva. - 2023.
- Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.
Coorientador: Rubens Gedraite.
Coorientadora: Emiliane Andrade Araújo Naves.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.8034>
Inclui bibliografia.
1. Engenharia Química. I. Coutinho Filho, Ubirajara, 1970-, (Orient.). II. Gedraite, Rubens, 1958-, (Coorient.). III. Naves, Emiliane Andrade Araújo, 1981-, (Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

CDU: 66.0



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-graduação em:	Engenharia Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado, 03/2023, PPGEQ				
Data:	27 de fevereiro de 2023	Hora de início:	14:30	Hora de encerramento:	17:50
Matrícula do Discente:	11913EQU010				
Nome do Discente:	Lucas Donizete Silva				
Título do Trabalho:	Aspectos cinéticos e termodinâmicos da adesão microbiana e modelagem e otimização da higienização <i>clean in place</i> utilizando fluxo pulsado				
Área de concentração:	Desenvolvimento de Processos Químicos				
Linha de pesquisa:	Modelagem, Controle e Otimização de Processos Químicos				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Projeto auxiliado por computador de processos industriais				
ODS-ONU:	ODS 9 - Indústria, Inovação e Infraestrutura				

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Emiliane Andrade Araújo Naves - ICTE/UFTM; Patrícia Campos Bernardes - PCTA/UFES; Luiz Gustavo Martins Vieira - PPGEQ/UFU, Rubens Gedraite - PPGEQ/UFU e Ubirajara Coutinho Filho - PPGEQ/UFU, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, o presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

aprovado

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ubirajara Coutinho Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/03/2023, às 09:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emiliane Andrade Araújo Naves, Usuário Externo**, em 03/03/2023, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rubens Gedraite, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/03/2023, às 12:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Gustavo Martins Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/03/2023, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Campos Bernardes, Usuário Externo**, em 07/03/2023, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4303035** e o código CRC **21206C74**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pelo seu amparo, sustentação e presença constante na minha vida.

Aos meus pais, Valéria e Nilson, pelos ensinamentos e exemplos transmitidos ao longo da vida.

Ao professor Rubens Gedraite, um grande ser humano, pelos ensinamentos, pela amizade, pelas oportunidades e confiança ao longo desta jornada, minha eterna gratidão.

À professora Emiliane A. A. Naves, pelos ensinamentos, colaboração e cooperação em todos os momentos. Meu muito obrigado por tudo!

Ao professor Ubirajara Coutinho Filho pela confiança e parceria neste projeto.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) por meio da Faculdade de Engenharia Química e o Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ) pela oportunidade de realização do Programa.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) pela parceria na execução deste projeto.

À professor Priscila Cristina Bizam Vianna pelas contribuições, atenção e ajuda nesta pesquisa.

Ao professor Luiz Gustavo pela participação e valiosas sugestões dadas para melhoria deste trabalho.

À minha namorada Bianca R. Samartin pelo companheirismo, estímulo e compreensão ao longo destes anos.

Aos amigos da Pós-graduação, Larissa Paiva, Ana Paula e Leonardo Carvalho pela amizade e companheirismo nestes anos de estudo.

À Maíra, Natália e Maristela, parceiras de laboratório e pesquisa, pela amizade e cooperação.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a execução e o sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO I - ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>LISTERIA INNOCUA</i> E <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i>: MODELAGEM CINÉTICA E ASPECTOS TERMODINÂMICOS	1
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. MATERIAIS E MÉTODOS	5
2.1 Preparo dos cupons de aço inoxidável	5
2.2 Microrganismos e condições de cultivo	5
2.3 Crescimento e Adesão	5
2.4 Modelagem cinética	6
2.5 Compostos exopoliméricos (EPS) do biofilme	12
2.6 Termodinâmica de adesão	13
2.7 Análise estatística	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 Modelagem cinética.....	17
3.2 Compostos da matriz exopolimérica	24
3.3 Hidrofobicidade das células bacterianas.....	26
4. CONCLUSÃO	29
5. REFERÊNCIAS.....	29
 CAPÍTULO II - HIGIENIZAÇÃO <i>CLEAN IN PLACE</i> (CIP): EFEITOS DA GEOMETRIA, DO MICRORGANISMO E ASPECTOS FLUIDODINÂMICOS	 34
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1 Microrganismo	38
2.2 Adesão microbiana.....	39
2.3 Unidade experimental	40
2.4 Simulação CFD	41
2.5 Higienização.....	44

2.6	Consumo operacional	46
2.7	Delineamento experimental e análise estatística	46
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1	Contaminação da superfície	47
3.2	Processo CIP	49
3.3	Consumo do processo	54
4.	CONCLUSÃO	55
5.	REFERÊNCIAS	55

CAPÍTULO III - FLUXO PULSADO NA SANITIZAÇÃO CLEAN IN PLACE (CIP) EM TUBULAÇÕES LÁCTEAS CONTAMINADAS COM *LISTERIA INNOCUA*..... 59

	RESUMO.....	59
	ABSTRACT.....	60
1.	INTRODUÇÃO	61
2.	MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1	Microrganismo	66
2.2	Adesão microbiana	66
2.3	Unidade experimental.....	67
2.4	Fluxo pulsado	68
2.5	Simulação CFD	68
2.6	Higienização	71
2.7	Delineamento experimental.....	73
2.8	Consumo energético do bombeamento	74
2.9	Análise estatística	75
2.10	Otimização multivariável	75
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1	Adesão microbiana na superfície das geometrias.....	76
3.2	Higienização tradicional	76
3.3	Higienização CIP pulsada.....	79
3.4	Consumo energético	94
3.5	Otimização.....	96
4.	CONCLUSÃO	97
5.	REFERÊNCIAS	98

CAPÍTULO IV - MODELAGEM DA SANITIZAÇÃO *CLEAN IN PLACE* COM FLUXO PULSADO DE TUBULAÇÕES CONTAMINADAS COM *LISTERIA INNOCUA* USANDO REDES NEURAIS ARTIFICIAIS..... 103

	RESUMO.....	103
	ABSTRACT.....	104

1. INTRODUÇÃO	105
2. MATERIAL E MÉTODOS	108
2.1 Microrganismo	108
2.2 Adesão microbiana	108
2.3 Unidade experimental	109
2.4 Higienização	110
2.5 Delineamento experimental	111
2.6 Modelagem e rede neural artificial (RNA)	111
2.7 Otimização	114
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
3.1 Dados experimentais	115
3.2 Determinação do número de neurônios	116
3.3 Predição da redução decimal	117
3.4 Comparativo entre RNA e RMS	120
3.5 Otimização da sanitização com modelo RNA	121
4. CONCLUSÃO	122
5. REFERÊNCIAS	123
 CAPÍTULO V - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Multiplicação de <i>L. innocua</i> ao longo de 24 h de cultivo a 4°C e ajuste cinético dos modelos.	19
Figura 1.2 – Adesão de <i>L. innocua</i> na superfície de aço inox ao longo de 24 h de cultivo a 4°C e ajuste cinético dos modelos.....	20
Figura 1.3 - Multiplicação de <i>L. innocua</i> ao longo de 24 h de cultivo a 37°C e ajuste cinético dos modelos.	21
Figura 1.4 - Adesão de <i>L. innocua</i> na superfície de aço inoxidável ao longo de 24 h de cultivo a 37°C e ajuste cinético dos modelos.	22
Figura 1.5 – Multiplicação de <i>P. fluorescens</i> ao longo de 24 h de cultivo a 4°C e ajuste cinético dos modelos.	22
Figura 1.6 - Adesão de <i>P. fluorescens</i> na superfície de aço inoxidável ao longo de 24 h de cultivo a 4°C e ajuste cinético dos modelos.....	23
Figura 1.7 – Multiplicação de <i>P. fluorescens</i> ao longo de 24 h de cultivo a 26°C e ajuste cinético dos modelos.	23
Figura 1.8 – Adesão de <i>P. fluorescens</i> na superfície de aço inoxidável ao longo de 24 h de cultivo a 26°C e ajuste cinético dos modelos.....	24
Figura 1.9 - Espectro FTIR para a superfície de aço inoxidável contaminado com <i>L. innocua</i> (A) e <i>P. fluorescens</i> (B) após 12 e 24 h.....	25
Figura 2.1 –Protótipo (A) e representação esquemática da linha de circulação (B).	40
Figura 2.2 - Representação do <i>layout</i> da tubulação e aplicação da malha.	42
Figura 2.3 - Queda de pressão em função do número de células na discretização da geometria.	43
Figura 2.4 - Curvas do fator de atrito experimental e calculado para os modelos de turbulência.	44
Figura 2.5 -Vetores de velocidade e tensão de cisalhamento (A, B) trecho reto, (C, D) tê, (E, F) cotovelo, (G, H) expansão e (I, J) redução.....	52
Figura 2.6 - Consumo de insumos (A) tempo, (B) volume de água e (C) energia em cada etapa no processo de higienização CIP.....	54
Figura 3.1 - Representação do fluxo pulsado e seus componentes.	65
Figura 3.2 -Representação esquemática da linha de circulação.	67
Figura 3.3 - Representação do <i>layout</i> da tubulação e aplicação da malha.	69

Figura 3.4 - Queda de pressão em função do número de células na discretização da geometria.	70
Figura 3.5 - Curvas do fator de atrito experimental e calculado para os modelos de turbulência.	71
Figura 3.6 - Superfície Resposta para redução decimal no trecho cilíndrico reto em função das variáveis: tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.	82
Figura 3.7 - Comportamento fluidodinâmico do sanitizante no interior da ramificação em t_e durante a aplicação do pulso.	84
Figura 3.8 - Superfície Resposta para redução decimal na ramificação da tubulação em formato t_e em função do tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.	85
Figura 3.9 - Fluidodinâmica do agente sanitizante no interior do cotovelo durante a aplicação do pulso.	87
Figura 3.10 - Superfície Resposta para redução decimal na curva da tubulação em função do tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.	88
Figura 3.11 - Fluidodinâmica do fluxo pulsado no interior da expansão.	89
Figura 3.12 - Superfície Resposta para redução decimal na expansão de diâmetro da tubulação em função do tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.	90
Figura 3.13 - Fluidodinâmica do fluxo pulsado no interior da redução de diâmetro. ...	92
Figura 3.14 - Superfície Resposta para redução decimal na redução de diâmetro da tubulação em função do tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.	93
Figura 3.15 - Superfície Resposta do consumo de energia com fluxo pulsado em função do tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.	95
Figura 4. 1 - Representação esquemática da rede neural <i>perceptron</i> em multicamadas para predição da redução decimal (RD) em função das entradas (t) tempo, (W) ondulação, (P) período e (C) concentração.	107
Figura 4. 2 - Representação esquemática da linha de circulação.	109
Figura 4. 3 - Algoritmo para desenvolvimento da arquitetura apropriada de RNAs. .	114
Figura 4. 4 - Erro quadrático médio em função do número de neurônios.	117
Figura 4. 5 - Correlação entre os valores de dados usados e as saídas previstas para trecho reto (a), ramificação em t_e (b), cotovelo (c), expansão (d) e redução (e) do conjunto de dados treino e teste.	120
Figura 4. 6 - Comparativo dos parâmetros de acurácia para modelagem RNA e RMS. – (a) coeficiente de correlação R^2 (b) parâmetro RMSE.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Componentes da tensão interfacial de líquidos de diferentes polaridades a 25°C	15
Tabela 1.2 - Parâmetros cinéticos do cultivo de <i>L. innocua</i> e <i>P. fluorescens</i> na temperatura ótima de cultivo e sob refrigeração para o modelo Logístico e Monod.	17
Tabela 1.3 - Valores dos ângulos de contato entre as superfícies do aço inoxidável e das células bacterianas com diferentes líquidos: água, formamida e α -bromonaftaleno.	26
Tabela 1.4 -Valores dos componentes apolares $\Delta G_{sas}^{LW} (mJ \cdot m^{-2})$ e polares $\Delta G_{sas}^{AB} (mJ \cdot m^{-2})$ da energia livre total de interação da superfície e células bacterianas.	27
Tabela 1.5 - Energia livre de adesão ($mJ \cdot m^{-2}$) entre diferentes espécies bacterianas e a interação com a superfície de aço inoxidável.	28
Tabela 2.1 – Adesão inicial das células de <i>L. innocua</i> e <i>P. fluorescens</i> nas diferentes geometrias após incubação estática.	47
Tabela 2.2 - Redução decimal para as bactérias e contagem final de células na superfície de cada geometria.	49
Tabela 3.1 - Configuração do fluxo pulsado na sanitização CIP.	68
Tabela 3.2 - Níveis das variáveis investigadas na sanitização CIP pulsada.	73
Tabela 3.3 - Matriz planejamento para sanitização pulsada no processo CIP.	74
Tabela 3.4 - Redução decimal de células em cada geometria.	77
Tabela 3.5 - Redução decimais em cada geometria e consumo de energia para cada configuração de pulso na sanitização.	79
Tabela 3.6 - Análise da variância (ANOVA) para redução decimal no quantitativo de <i>Listeria innocua</i> aderida à superfície interna das geometrias.	80
Tabela 3.7 -Comparativo na redução decimal de células de <i>L. innocua</i> nas geometrias aplicando fluxo constante e a condição pulsada otimizada.	96
Tabela 4. 1 - Variáveis de entrada e saída na rede neural e respectivas faixas de valores.	113
Tabela 4. 2 - Configurações de fluxo pulsado e redução decimal observada.	116
Tabela 4. 3 - Parâmetros de acurácia no modelo RNA para os dados treino e teste. ..	118
Tabela 4. 4 - Comparativo na redução decimal (RD) de células de <i>L. innocua</i> nas diferentes geometrias estimada pela RNA e o valor observado.	122

RESUMO

A higienização *clean in place* (CIP) é uma das técnicas mais empregadas na limpeza e sanitização de superfícies na indústria de alimentos e fármacos. No entanto, alguns pontos nas tubulações são desafiadores devido à geometria e à fluidodinâmica do escoamento. A busca por modelos e otimização do processo CIP é fundamental para qualidade e segurança microbiológica dos produtos. Nesse sentido, o objetivo do Capítulo 1 foi avaliar a multiplicação de *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e *Listeria innocua* (ATCC 33090), estimar parâmetros cinéticos de crescimento, medir a hidrofobicidade das células e da superfície de aço inoxidável e verificar a presença de exopolissacarídeos (EPS). No capítulo 2 avaliou-se a higienização de cinco geometrias: trecho cilíndrico reto, ramificação em T, curva 90°, expansão e redução de diâmetro, contaminadas com os dois microrganismos empregando fluxo constante de sanitizante. No capítulo 3, a sanitização foi aplicada com fluxo pulsado para avaliar o efeito do tempo, ondulação, período do pulso e concentração do agente químico. O comportamento da redução decimal de células foi modelado por meio da metodologia de Superfície Resposta (RMS) e a otimização feita pela técnica da desejabilidade. Além disso, investigou-se o comportamento fluidodinâmico no interior dessas geometrias. No capítulo 4 desenvolveu-se um modelo baseado em redes neurais artificiais (RNA) para sanitização de *Listeria innocua* com fluxo pulsado e determinou-se o ponto ótimo de operação. Foram utilizados cupons e tubos de aço inoxidável 304, polimento #4. Para determinar o crescimento das células foi realizado, periodicamente, a amostragem do leite e da superfície utilizando contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas. Os modelos cinéticos foram feitos pela estimação dos parâmetros. A hidrofobicidade e a termodinâmica de adesão foram determinadas por meio do ângulo de contato. A produção de EPS foi investigada por espectroscopia no infravermelho FTIR. Na higienização, uma linha de circulação foi contaminada com os microrganismos. Em seguida, as geometrias foram higienizadas e a amostragem realizada pela técnica de *swab* e o desempenho da higienização foi avaliado com base nas reduções decimais de células. O estudo fluidodinâmico foi realizado com *software* FLUENT versão *Student* e o consumo energético com sensor de corrente elétrica. Observou-se que sob refrigeração *L. innocua* apresentou uma fase *lag* e depois crescimento no número de células. Já *P. fluorescens* não apresentou crescimento e não houve avanço da adesão. Na temperatura ótima, *L. innocua* não apresentou fase *lag* e *P. fluorescens* apresentou uma fase *lag*. A adesão de *L. innocua* foi significativamente superior a *P. fluorescens*. *L. innocua* apresentou velocidade específica de crescimento superior a *P. fluorescens*. Além disso, o parâmetro da equação de Luedeking-Piret mostrou que a adesão é associada ao crescimento das células em ambos os microrganismos. A análise FTIR revelou que *L. innocua* não sintetizou EPS dentro do período de avaliação, já *P. fluorescens* produziu EPS desde 12 h. Ambas as espécies foram hidrofílicas, sendo *L. innocua* menos hidrofílica e mais favorável energeticamente à adesão. A redução decimal na sanitização tradicional mostrou que o trecho cilíndrico reto e a redução apresentaram os melhores níveis de higienização em detrimento da ramificação em T, para os dois microrganismos, em função da formação de zonas de estagnação, observada na simulação fluidodinâmica. As variáveis do fluxo pulsado foram significativas na sanitização. A condição ótima demandou menor tempo de operação, economia de energia e de agente sanitizante. Por último, o modelo RNA foi capaz de ajustar com precisão aos dados experimentais e comparativamente, foi mais precisa do que as predições indicadas pela técnica RMS.

Palavras-chave: Adesão, zona de estagnação, otimização, fluidodinâmica.

ABSTRACT

Clean in place (CIP) is one of the most used techniques for cleaning and sanitizing surfaces in the food and pharmaceutical industry. However, some points in the pipes are complicated due to the geometry and fluid dynamics of the flow. The search for models and optimization of the CIP process is essential for the quality and microbiological safety of products. In this sense, the objective of Chapter 1 was to evaluate the multiplication of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) and *Listeria innocua* (ATCC 33090), estimate kinetic parameters of growth, measure the hydrophobicity of cells and the surface of stainless steel and verify the presence of exopolysaccharides (EPS). In chapter 2, the geometry of five geometries was evaluated: straight cylindrical section, tee branching, 90° curve, expansion and diameter reduction, contaminated with the two microorganisms using a constant flow of sanitizer. In chapter 3, sanitization was applied with pulsed flow to evaluate the effect of time, ripple, pulse period and chemical agent concentration. The behavior of the decimal cell reduction was modeled using the Response Surface (RMS) methodology and the optimization was performed using the desirability technique. In addition, the fluid dynamic behavior within these geometries was investigated. In chapter 4, a model based on artificial neural networks (ANN) was developed for the sanitization of *L. innocua* with pulsed flow and the optimal point of operation was determined. 304 stainless steel tubes and tubes, #4 polish, were used. To determine cell growth, milk and surface priming were periodically performed using colony forming units (CFU) counts on plates. Kinetic models were made by parameter compliance. The hydrophobicity and thermodynamics of adhesion were determined by means of the contact angle. EPS production was investigated by FTIR infrared spectroscopy. In hygiene, a circulation line was contaminated with microorganisms. Then, the geometries were sanitized and the volunteer performed by the swab technique and the stabilization performance was evaluated based on the decimal reductions of cells. The fluid dynamic study was carried out with the FLUENT software Student version and the energy consumption with an electric current sensor. It was observed that under refrigeration *L. innocua* presented a lag phase and then growth in the number of cells. *P. fluorescens*, on the other hand, did not show growth and there was no improvement in adherence. At optimal temperature, *L. innocua* did not show a lag phase and *P. fluorescens* showed a lag phase. Adherence of *L. innocua* was significantly higher than *P. fluorescens*. *L. innocua* showed a higher specific growth rate than *P. fluorescens*. Furthermore, the Luedeking-Piret equation parameter showed that adhesion is associated with cell growth in both microorganisms. FTIR analysis revealed that *L. innocua* did not synthesize EPS within the evaluation period, while *P. fluorescens* produced EPS from 12 h. Both species were hydrophilic, with *L. innocua* being less hydrophilic and energetically more favorable to adhesion. The decimal reduction in the traditional sanitization showed that the straight cylindrical section and the reduction presented the best levels of sanitization in detriment of the tee branching, for both microorganisms, due to the formation of stagnation zones, observed in the fluid dynamic simulation. Pulsed flow variables were significant in sanitization. The optimal condition required less operating time, saving energy and sanitizing agent. Lastly, the ANN model was able to accurately fit the experimental data and was comparatively more accurate than the predictions indicated by the RMS technique.

Keywords: Adhesion, stagnation zone, optimization, fluid dynamics.

CAPÍTULO I - ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *LISTERIA INNOCUA* E *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*: MODELAGEM CINÉTICA E ASPECTOS TERMODINÂMICOS

RESUMO: A qualidade e o tempo de prateleira dos alimentos industrializados estão diretamente relacionados às condições higiênico-sanitárias do ambiente em que foram processados e às técnicas de conservação empregadas. Nesse sentido, o objetivo deste capítulo foi (i) avaliar a multiplicação de dois microrganismos psicrotróficos: *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e *Listeria innocua* (ATCC 33090), em duas temperaturas diferentes, (ii) estimar parâmetros cinéticos de crescimento usando modelo Monod e Logístico (iii) analisar a relação entre a concentração celular e adesão por meio da abordagem de Luedeking-Piret; iv) medir a hidrofobicidade das células e da superfície de aço inoxidável e os aspectos associados à termodinâmica da adesão e v) verificar a presença de exopolissacarídeos (EPS) durante o processo de adesão. Para isso, foram utilizados cupons de aço inoxidável 304, polimento #4. Para determinar o crescimento das células foi realizado, periodicamente, a amostragem do leite e da superfície por meio de *rinsagem*, utilizando contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas. Os ajustes dos modelos cinéticos foram feitos pela estimação dos parâmetros. A hidrofobicidade e a termodinâmica de adesão foram realizadas usando medidas do ângulo de contato entre essas interfaces e três diferentes líquidos com polaridades diferentes com auxílio de um goniômetro. A produção de EPS durante o processo de adesão das células foi determinado por espectroscopia no infravermelho FTIR para análise dos componentes presentes na superfície. Observou-se que, sob refrigeração, a 4 °C *L. innocua* apresentou uma fase *lag* e depois houve crescimento no número de células. Já *P. fluorescens*, sob refrigeração, não apresentou crescimento no número de células no leite e não houve avanço no nível de adesão. Na temperatura ótima de crescimento, *L. innocua* não houve fase *lag*, exibindo crescimento imediato e alcançou $8,02 \pm 0,08 \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. O desenvolvimento da adesão apresentou perfil similar ao crescimento das células no leite, alcançando em média $4,81 \pm 0,11 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. *P. fluorescens*, na temperatura ótima, apresentou uma fase *lag*, inicialmente, e em seguida, apresentou crescimento e alcançou $7,88 \pm 0,11 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ e na superfície do cupom chegou a $3,87 \pm 0,06 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. O nível de adesão de *L. innocua* foi significativamente superior às células de *P. fluorescens*. Os parâmetros cinéticos mostraram que *L. innocua* apresentou velocidade específica de crescimento superior a *P. fluorescens*. Além disso, o parâmetro da equação de Luedeking-Piret mostrou que o desenvolvimento da adesão é associado ao crescimento das células em ambos os microrganismos estudados. A análise FTIR revelou que *L. innocua* não sintetizou EPS dentro do período de avaliação, já *P. fluorescens* produziu EPS desde 12 h de incubação. A análise termodinâmica evidenciou que ambas as espécies bacterianas foram hidrofílicas, sendo *L. innocua* menos hidrofílica e mais favorável energeticamente à adesão.

Palavras-chave: Bactérias psicrotróficas, Adesão, Leite, Biofilmes

ABSTRACT: The quality and shelf life of processed foods are directly related to the hygienic-sanitary conditions of the environment in which they were processed and the conservation techniques employed. In this sense, the objective of this chapter was (i) to evaluate the multiplication of two psychrotrophic microorganisms: *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) and *Listeria innocua* (ATCC 33090), at two different temperatures, (ii) to estimate kinetic parameters of growth using Monod and Logistic model (iii) analyze the relationship between cell concentration and adhesion through the Luedeking-Piret approach; iv) measure the hydrophobicity of the cells and the stainless steel surface and aspects associated with the adhesion thermodynamics and v) verify the presence of exopolysaccharides (EPS) during the adhesion process. For this, 304 stainless steel coupons, polish #4, were used. To determine cell growth, milk and surface samples were periodically sampled by rinsing, using colony forming units (CFU) counts on plates. Adjustments of the kinetic models were made by estimating the parameters. Hydrophobicity and thermodynamics of adhesion were performed using measurements of the contact angle between these interfaces and three different liquids with different polarities with the aid of a goniometer. The production of EPS during the cell adhesion process was determined by FTIR infrared spectroscopy to analyze the components present on the surface. It was observed that under refrigeration at 4 °C *L. innocua* presented a lag phase and then there was growth in the number of cells. *P. fluorescens*, under refrigeration, did not show growth in the number of cells in the milk and there was no advance in the level of adhesion. At the optimum growth temperature, *L. innocua* did not have a lag phase, showing immediate growth and reaching a count of $8.02 \pm 0.08 \log \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$. Adhesion development showed a similar profile to cell growth in milk, reaching an average of $4.81 \pm 0.11 \log \text{ CFU} \cdot \text{cm}^{-2}$. *P. fluorescens*, at the optimal temperature, presented a lag phase, initially, and then presented growth and reached a level of $7.88 \pm 0.11 \log \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ and on the surface of the coupon it reached $3.87 \pm 0.06 \log \text{ CFU} \cdot \text{cm}^{-2}$. The level of adhesion of *L. innocua* was significantly higher than *P. fluorescens* cells. Kinetic parameters showed that *L. innocua* had a higher specific growth rate than *P. fluorescens*. Furthermore, the parameter of the Luedeking-Piret equation showed that the development of adhesion is associated with cell growth in both microorganisms studied. FTIR analysis revealed that *L. innocua* did not synthesize EPS within the evaluation period, whereas *P. fluorescens* produced EPS from 12 h of incubation. The thermodynamic analysis showed that both bacterial species were hydrophilic, with *L. innocua* being less hydrophilic and more energetically favorable to adhesion.

Keywords: Psychrotrophic bacteria, Adhesion, Milk, Biofilms

1. INTRODUÇÃO

A falta de conservação e a deterioração de produtos alimentícios são fatores responsáveis pela perda de muitos alimentos nas diversas fases da cadeia alimentar, desde a produção, processamento, distribuição até o consumo (WANG et al., 2018). Essas perdas são causadas, principalmente, devido às práticas de higiene ineficientes, superfícies de equipamentos contaminados com microrganismos e armazenamento inadequado (CARRASCO, MORALES-RUEDA, E GARCIA-GIMENO, 2012).

Esses microrganismos podem ser patogênicos ou deterioradores e oriundos de diferentes fontes, incluindo a água, o solo ou o ar (SREY et al., 2013). A presença e liberação desses microrganismos em uma planta industrial pode trazer consequências indesejáveis à qualidade do alimento, causar alteração físico-química do produto e gerar perdas econômicas (CHAVANT et al., 2007; ROSSI et al., 2016). Além disso, essas células podem aderir-se fortemente à superfície com a produção de substâncias poliméricas extracelulares para proteção das células formando um biofilme em que são mais resistentes a ação dos agentes sanitizantes (COSTERTON, 1999; SU et al., 2022).

Nesse sentido, as espécies bacterianas *Listeria innocua* e *Pseudomonas fluorescens* são psicrotróficos e capazes de multiplicarem em temperaturas de refrigeração e provocar a deterioração do alimento. Em especial, *P. fluorescens* induz mudanças na estrutura e cor de alimentos, devido à produção de lecitinase (fosfolipase C) e enzimas proteolíticas (ROSSI et al., 2016). Além disso, produzem exopolissacarídeos, que contribuem à formação de biofilme (CAIXETA et al., 2012). *L. innocua* é fisiologicamente similar a *L. monocytogenes*, e ambas podem ocorrer nos mesmos produtos alimentares, sendo essa última uma cepa patogênica (CORNU et al., 2001; CARPENTIER e CERF, 2011).

Dessa forma, modelos matemáticos de crescimento podem ser aplicados para descrever a evolução destes microrganismos deteriorantes no meio em função do tempo e prever situações de risco (HUANG, 2008). Atrelado ao crescimento microbiano, é necessário conhecer a evolução da adesão das células às superfícies de equipamentos e tubulações. Essas previsões na cinética de contaminação do alimento e da superfície podem ser empregadas em avaliações de risco à segurança microbiológica e na tomada de decisão sobre as condições de uso e processamento da superfície de equipamentos (CESARE et al., 2018).

Existem inúmeros modelos cinéticos para descrever a taxa de crescimento de bactérias. Esses métodos podem ser divididos em métodos estruturados e não estruturados. Os modelos estruturados consideram atributos genéticos, morfológicos, bioquímicos e o estado fisiológico das células. Embora esses modelos sejam capazes de descrever taxa de crescimento específica, eles são complicados e exigem inúmeras informações e equações para resolvê-los (MULOIWA et al., 2020). Os modelos não estruturados consideram as bactérias como organismos independentes que interagem com o meio e descrevem a taxa de crescimento com base na biomassa e na concentração de substrato (DONG et al., 2015).

Além da velocidade de crescimento das células, há diversas outras etapas envolvidas na adesão e formação do biofilme e que são extensivamente relatadas na literatura. Inicialmente, os resíduos de alimentos formam um filme condicionante para fixação de células planctônicas de forma a iniciar a fixação irreversível das células e produção de substâncias poliméricas extracelulares que viabilizam a adesão e formação de biofilme (OLIVEIRA et al., 2010).

Os microrganismos do gênero *Listeria* spp e *Pseudomonas* spp têm a capacidade de aderir e formar biofilmes sobre as superfícies do equipamento de processamento de alimentos feito de diversos materiais, tais como poliestireno, polímeros, plástico, vidro, teflon, borracha e aço inoxidável (AUGUSTÍN e BRUGNONI, 2018; YU e SHI, 2021). A adesão bacteriana às superfícies é influenciada pelas propriedades físico-químicas do ambiente, tais como, temperatura e pH do meio, hidrofobicidade da superfície e do microrganismo e pelas características morfológicas das células e suas funções, como os apêndices celulares e a motilidade (GALIÉ et al., 2018).

Nesse contexto, o objetivo deste capítulo foi (i) avaliar o crescimento microbiano de *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria innocua* em duas temperaturas, (ii) estimar parâmetros cinéticos por meio de modelos de Monod e Logístico, (iii) analisar a relação entre a concentração celular e o crescimento com a adesão e formação de biofilme por meio da abordagem de Luedeking-Piret, iv) investigar a hidrofobicidade das células e da superfície de processamento e os aspectos associados à termodinâmica da adesão e v) analisar a produção de exopolissacarídeos (EPS) durante o processo de adesão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo dos cupons de aço inoxidável

Os cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 (10 mm x 10 mm) foram imersos em detergente neutro por uma 1 h, em seguida enxaguados com água destilada, secos e limpos com álcool etílico (70%). Depois foram enxaguados com água destilada e secos por 2 h a 60°C e autoclavados a 121°C durante 15 min conforme proposto por Toloi Torqueti et al. (2019).

2.2 Microrganismos e condições de cultivo

Os estudos realizados utilizaram *Listeria innocua* (ATCC 33090) e *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525). As culturas estavam liofilizadas e foram ativadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por três vezes durante 24 h em suas temperaturas ótimas de crescimento, sendo 37°C para *L. innocua* e 26°C para *P. fluorescens*. O número de microrganismos foi determinado por contagem total em placa utilizando o ágar padrão de contagem (PCA) e expresso em unidades formadoras de colônias (UFC).

2.3 Crescimento e Adesão

Após três inoculações sucessivas em BHI (Brain Heart Infusion), para obtenção da cultura bacteriana fisiologicamente ativa, inoculou-se 10 µL de cada cultura em 10 mL de leite integral, inicialmente esterilizado em autoclave, para produzir uma contaminação inicial menor que $3 \cdot 10^5$ UFC·mL⁻¹, valor máximo para Contagem Padrão em Placas no leite cru, de acordo com a indicação da Instrução Normativa Nº 76, de 26 de Novembro de 2018 (MAPA).

Imediatamente após a inoculação, inseriu-se os cupons de aço inoxidável no meio e o sistema foi incubado na temperatura ótima de cada cultura. Em outro lote de experimentos foi realizado a incubação sob condições de refrigeração, a 4°C, temperatura recomendada para estocagem do leite conforme Instrução Normativa Nº 76 de 2018. A cada 2 h, um conjunto era retirado da incubação para determinação da contaminação no leite (UFC·mL⁻¹) e da adesão na superfície do aço inoxidável (UFC·cm⁻²) durante 24 h de

avaliação, período máximo indicado de operação da planta sem higienização (WANG et al., 2018).

Uma alíquota de leite foi retirada e foram feitas diluições seriadas em água peptonada (0,1%) e plaqueamento em PCA. O cupom foi removido do meio com auxílio de uma pinça esterelizada e inserido em água peptonada (0,1%) durante 2 min para remoção das células planctônicas ou fracamente aderidas (FIGUEREDO et al., 2009). Em seguida, foi feita a remoção das células aderidas por meio da *rinsagem* com agitação em vórtex por 2 min. Foram feitas diluições seriadas com o líquido da *rinsagem* em água peptonada (0,1%) e plaqueamento em ágar PCA. As placas eram incubadas na temperatura ótima de crescimento por 24 h.

O número de células aderidas foi expresso em UFC·cm⁻² (Equação 1.1) mostrada por Parizzi et al. (2004). As determinações foram feitas em triplicata com duas réplicas para cada ponto.

$$Contagem[UFC \cdot cm^{-2}] = \frac{NV_R}{V_D A} \quad (1.1)$$

em que

N : média do número de unidades formadoras de colônias [UFC];

V_A : volume da amostra usado no plaqueamento da amostra [mL];

V_R : volume de diluente usado para rinsagem [mL];

A : área do cupom [cm²]

2.4 Modelagem cinética

A produção de determinado metabólito ou fenômeno pode estar intimamente associada ao crescimento celular, de tal forma que só haverá a ocorrência quando ocorrer crescimento (BASTOS, 2010). Dessa forma, para analisar a cinética da adesão e avaliar se o fenômeno de fixação das células à superfície foi associado ou não ao crescimento, pode-se utilizar a descrição cinética de formação de um produto (P) segundo a equação de Gaden e Luedeking-Piret mostrada na Equação 1.2.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (1.2)$$

em que dP/dt representa a taxa de formação de um produto em função do tempo, X a quantidade de células e dX/dt representa a variação no número de células. Os coeficientes α e β são constantes empíricas.

A maior magnitude do parâmetro α indica que o fenômeno de adesão foi majoritariamente associado ao crescimento das células, expresso por dX/dt . Já a prevalência do coeficiente β indica que o processo não foi associado ao crescimento. Já a descrição do crescimento microbiano (X) pode ser expressa em função de diversos modelos cinéticos, como modelo logístico ou como modelo de Monod.

2.4.1. Modelo logístico Luedeking-Piret (LLP)

O crescimento microbiano pode ser expresso pelo modelo Malthusiano quando o substrato limitante não pode ser identificado. No entanto, essa abordagem considera o crescimento indefinido sem levar em conta as limitações de nutrientes e espaço. Nesse sentido, Verlhust propôs que as taxas de natalidade (b_t) e mortalidade (d_t) variam de acordo com a densidade populacional (GOMES, 2003) de forma que a taxa de crescimento pode ser expressa como mostrado na Equação 1.3.

$$\frac{dX}{dt} = (b_t - d_t)X \quad (1.3)$$

Assim, se a densidade populacional ultrapassar níveis sustentáveis pelo meio, a taxa de natalidade sofre redução e a taxa de mortalidade aumenta. Por outro lado, se a população estiver abaixo da capacidade do meio, a taxa de natalidade tende a aumentar em detrimento a taxa de mortalidade que experimenta de redução (LEITE, 2006). Essas considerações podem ser expressas como indicado nas Equações 1.4 e 1.5.

$$b_t = b_0 - pX \quad (1.4)$$

$$d_t = d_0 + qX \quad (1.5)$$

sendo

b_0 : taxa de natalidade máxima;

d_0 : taxa de mortalidade mínima

p, q : coeficientes de velocidade para natalidade e mortalidade da população;

A diferença entre a taxa de natalidade máxima (b_0) e taxa de mortalidade mínima (d_0) corresponde à taxa intrínseca de crescimento da população microbiana (μ_{max}). Assim, com essa consideração e substituindo as Equações (1.4), (1.5) em (1.3), tem-se a taxa de crescimento expressa como mostrada na Equação 1.6.

$$\frac{dX}{dt} = [\mu_{max} - (p + q)X]X \quad (1.6)$$

A taxa de crescimento é nula quando não há células no meio ($X=0$) ou quando a concentração celular (X) é igual a $\mu_{max}/(p+q)$. Nessa condição, a população permanece numa constante máxima (K). Assim, substituindo a razão $\mu_{max}/(p+q)$ por K (Equação 1.7):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \left(1 - \frac{X}{K} \right) \quad (1.7)$$

A forma integrada da taxa de crescimento é conhecida como equação logística (Equação 1.8) do crescimento e é dada por:

$$X = \frac{X_0 K e^{\mu_{max} t}}{K + X_0 (e^{\mu_{max} t} - 1)} \quad (1.8)$$

Para a formação da adesão, a relação de Luedeking-Piret (Equação 1.2) pode ser parcialmente integrada com mostrado por Garnier e Gaillet (2015) e apresentado na Equação 1.9.

$$P - P_0 = \alpha(X - X_0) + \beta \int_{t=0}^t X dt \quad (1.9)$$

Expressando a concentração celular (X) com a equação logística de crescimento (Equação 1.8), a equação de Luedeking-Piret integrada torna-se (Equação 1.10):

$$P - P_0 = \alpha \cdot \left(\frac{X_0 K e^{\mu_{max} t}}{K + X_0 (e^{\mu_{max} t} - 1)} - X_0 \right) + \beta \cdot \left(\frac{K \ln[X_0 (e^{\mu_{max} t} - 1) + K]}{\mu_{max}} \right) \quad (1.10)$$

2.4.2. Modelo combinado Monod Luedeking-Piret (MLP)

As relações do modelo cinético de Monod combinado com a abordagem de Luedeking-Piret baseiam-se no balanço de três variáveis: massa de célula (X), substrato

limitante (S) e concentração do produto (P), ambos em função do tempo (t), conforme mostrado nas Equações (1.11), (1.12) e (1.2).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1.11)$$

$$\frac{dS}{dt} = -q_s X \quad (1.12)$$

sendo μ é a taxa de crescimento específico, definido pela lei de Monod (Equação 1.13).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (1.13)$$

em que $\mu_{\max}$ é a taxa específica máxima de crescimento e K_s é a constante relacionada ao substrato e S é a concentração de substrato limitante no meio. A taxa específica de consumo do substrato q_s é definida como mostrado na Equação 1.14:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad (1.14)$$

O coeficiente de rendimento da célula sobre o substrato ($Y_{X/S}$) é definido como apresentado na Equação 1.15

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (1.15)$$

Considerando que o substrato seja constante, é possível utilizar o parâmetro $Y_{X/S}$ para desenvolver uma relação entre a concentração de substrato (S) e células (X) no meio, conforme mostrado na Equação 1.16:

$$S = \frac{1}{Y_{X/S}} (X_{\max} - X) \quad (1.16)$$

em que $X_{\max}$ refere-se a concentração máxima de células na fase estacionário do crescimento microbiano. Utilizando as estratégias propostas por Garnier and Gaillet (2015) foi possível avaliar a cinética desse fenômeno com modelo combinado de MLP. Assim, substituindo a expressão da Equação 1.16 na equação de Monod para taxa de crescimento específico (Equação 1.13), tem-se o resultado mostrado na Equação 1.17:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \left[\frac{1}{Y_{X/S}} (X_{\max} - X) \right]}{K_S + \left[\frac{1}{Y_{X/S}} (X_{\max} - X) \right]} \quad (1.17)$$

Agora, substituindo a Equação 1.17 na Equação 1.11 e multiplicando a razão pelo coeficiente de rendimento da célula sobre o substrato ($Y_{X/S}$), a taxa de crescimento celular pode ser expressa como apresentado na Equação 1.18:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} (X_{\max} - X)}{K_S Y_{X/S} + (X_{\max} - X)} X \quad (1.18)$$

A integração da Equação 1.18 por meio de separação de variáveis no intervalo inicial da contaminação com concentração celular X_0 até um tempo genérico t com contaminação final igual a X gera a seguinte expressão mostrada na Equação 1.19.

$$\mu_{\max} t = \left[\frac{K_S Y_{X/S} + X_{\max}}{X_{\max}} \right] \ln \left(\frac{X}{X_0} \right) - \left[\frac{K_S Y_{X/S}}{X_{\max}} \right] \ln \left(\frac{X_{\max} - X}{X_{\max} - X_0} \right) \quad (1.19)$$

A expressão mostrada na Equação 1.19 é uma relação analítica não explícita da contaminação X em função do tempo, dados os parâmetros $Y_{X/S} K_S$ e $\mu_{\max}$. Por outro lado, essa equação pode ser empregada para estimar os parâmetros de crescimento por meio de uma regressão linear considerando a cinética de crescimento, ou seja, dados de contaminação X em função do tempo t .

Nesse sentido, é possível escrever a Equação 1.19 como mostrado na Equação 1.20, agrupando as constantes em fatores a_1 e a_2 .

$$t = a_1 \ln \left(\frac{X}{X_0} \right) + a_2 \ln \left(\frac{X_{\max} - X}{X_{\max} - X_0} \right) \quad (1.20)$$

A Equação 1.20, pode ser ainda expressa considerando o tempo da fase *lag*, conforme mostrado na Equação 1.21.

$$\mu_{\max} (t - t_{lag}) = \left[\frac{K_S Y_{X/S} + X_{\max}}{X_{\max}} \right] \ln \left(\frac{X}{X_0} \right) - \left[\frac{K_S Y_{X/S}}{X_{\max}} \right] \ln \left(\frac{X_{\max} - X}{X_{\max} - X_0} \right) \quad (1.21)$$

Sendo os fatores a_1 e a_2 calculados conforme mostrado nas Equações 1.22 e 1.23.

$$a_1 = \frac{(K_S Y_{X/S} + X_{\max})}{\mu_{\max} X_{\max}} \quad (1.22)$$

$$a_2 = -\frac{K_S Y_{X/S}}{\mu_{\max} X_{\max}} \quad (1.23)$$

De posse dos fatores a_1 e a_2 é possível determinar a taxa de crescimento específico máximo, como mostrado na Equação 1.24.

$$\mu_{\max} = \frac{1}{a_1 + a_2} \quad (1.24)$$

Para a formação da adesão, a relação de Luedeking-Piret (Equação 1.2) pode ser parcialmente integrada como mostrado na Equação 1.9. No entanto, como mostrado por Garnier e Gaillet (2015) a solução analítica é dificultada, já que o último termo que representa a contaminação X ao longo do tempo não está explícito na Equação 1. 20.

Dessa forma, aqueles autores sugerem a integração por partes da última parcela da Equação 1.9 como mostrado na Equação 1.25. Assumindo t como dependente e integrando $X=X_0$ para $t=0$ e $X=X$ para tempo genérico t , tem-se:

$$\int_{t=0}^t X dt = Xt - \int_{X_0}^X t dX \quad (1.25)$$

Dessa forma, integrando a última parcela da Equação 1.25, expressando t como mostrado na Equação 1.20, tem-se a Equação 1.26:

$$\int_{X_0}^X t dX = \frac{1}{\mu_{\max}} \left[\left\{ X \ln \left(\frac{X}{X_0} \right) - (X - X_0) \right\} + \frac{K_S Y_{X/S}}{X_{\max}} \left\{ (X_{\max} - X) \ln \left(\frac{X_{\max} - X}{X_{\max} - X_0} \right) + X \ln \left(\frac{X}{X_0} \right) \right\} \right] \quad (1.26)$$

Assim a integral apresentada na Equação 1.25 pode ser escrita como mostrado na Equação 1.27:

$$\int_{t=0}^t X dt = \frac{1}{\mu_{\max}} \left[X - X_0 - K_S Y_{X/S} \ln \left(\frac{X_{\max} - X}{X_{\max} - X_0} \right) \right] \quad (1.27)$$

Substituindo o resultado mostrado na Equação 1.27 na Equação 1.9, chega-se na Equação 1.28 para avaliar a evolução da adesão (P) na superfície do aço inoxidável em função da contaminação (X) no meio.

$$P - P_0 = \left[\alpha + \frac{\beta}{\mu_{\max}} \right] (X - X_0) - \frac{\beta K_S Y_{X/S}}{\mu_{\max}} \ln \left(\frac{X_{\max} - X}{X_{\max} - X_0} \right) \quad (1.28)$$

A Equação 1.28 pode ainda ser reescrita como mostrado para viabilizar as estratégias de regressão linear das variáveis, como mostrado na Equação 1.29

$$P - P_0 = b_1 (X - X_0) + b_2 \ln \left(\frac{X_{\max} - X}{X_{\max} - X_0} \right) \quad (1.29)$$

em que:

$$b_1 = \alpha + \frac{\beta}{\mu_{\max}} \quad (1.30)$$

$$b_2 = - \frac{\beta K_S Y_{X/S}}{\mu_{\max}} \quad (1.31)$$

Por fim, os parâmetros b_1 e b_2 permitem calcular os coeficientes α e β da Equação 1.2, segundo a cinética de Monod, como mostrado nas Equações 1.32 e 1.33 respectivamente.

$$\alpha = b_1 + \frac{b_2}{K_S Y_{X/S}} \quad (1.32)$$

$$\beta = - \frac{b_2 \mu_{\max}}{K_S Y_{X/S}} \quad (1.33)$$

2.5 Compostos exopoliméricos (EPS) do biofilme

A determinação da composição dos exopolissacarídeos presentes no biofilme foram realizados por FTIR conforme descrito por Wang et al. (2018). As superfícies foram avaliadas após 12 h e 24 h de incubação com leite inoculado com cada microrganismo. Assim, após o período de incubação, as superfícies foram enxaguadas assepticamente três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v) para remover as células planctônicas. Os cupons

foram secos ao ar à temperatura ambiente. Os espectros foram coletados no modo de transmissão de 2000 a 800 cm^{-1} com espectrômetro Shimadzu com resolução 2 cm^{-1} e 128 scans.

O espectro das placas de aço inoxidável sem biofilme foi usado para remover o fundo espectral. Os espectros foram analisados e tratados no software *OriginPro* 8.0. Os picos correspondentes aos grupos funcionais foram pesquisados e identificados de acordo com referências disponíveis na literatura.

2.6 Termodinâmica de adesão

A variação na energia livre de Gibbs da adesão foi empregada para avaliar a termodinâmica de adesão dos microrganismos. Para isso, realizou-se a medida do ângulo de contato na superfície de uma camada de células vegetativas como descrito por Busscher et al. (1984).

As espécies foram ativadas em caldo BHI (Merck), três vezes consecutivas, para produzir uma suspensão de células ativa com contagens de, aproximadamente, 10^7 UFC·mL⁻¹. Posteriormente, 30 mL da suspensão ativa foram centrifugados a 12000 g por 10 min em centrífuga marca Fanem 206 BLII, para separação das células e do líquido sobrenadante.

Em seguida, o conteúdo obtido foi lavado por três vezes em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M e a massa celular obtida foi ressuspensa neste mesmo tampão, sendo depositada sobre um filtro de membrana de acetato celulose de 0,45 μm de poro e 47 mm de diâmetro por filtração utilizando pressão negativa. Foram adicionados 30 mL de água ultrapura no momento da filtração.

Para padronizar o conteúdo de umidade, os filtros foram transferidos para Placas de Petri contendo 1% de ágar (p/v) e 10% de glicerol (v/v). As membranas foram cortadas em três partes sendo cada parte usada para medição do ângulo de contato com cada líquido diferente. As medidas de ângulos de contato foram realizadas para três líquidos com diferentes polaridades (água, formamida e α -bromonaftaleno)

2.6.1 Determinação do ângulo de contato

A energia livre de Gibbs da interação hidrofóbica ΔG_{sws}^{tot} entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (w) foi calculada pelo somatório das componentes apolar e

polar da energia livre de interação ΔG_{sWS}^{LW} e ΔG_{sWS}^{AB} , respectivamente, conforme mostrado na Equação 1.34 (VAN OSS, 1994).

$$\Delta G_{sWS}^{tot} = \Delta G_{sWS}^{LW} + \Delta G_{sWS}^{AB} \quad (1.34)$$

O valor de ΔG_{sWS}^{tot} , ou ΔG_{bwb}^{tot} , para predizer em relação à hidrofobicidade de um substrato (s) ou de uma superfície celular (b) pode ser determinado expressando a primeira parcela da equação 1.34 (ΔG_{sWS}^{LW}) considerando a tensão interfacial da componente apolar pela interação de Lifshitz-van der Waals da superfície e da água, conforme mostrado na Equação 1.35. Já a segunda parcela da Equação 1.34, referente à componente polar, considera a interação de ácido-base de Lewis entre bactéria e superfície (Equação 1.36). O fator γ^+ refere-se ao parâmetro receptor de elétrons e γ^- refere-se ao parâmetro doador de elétrons da tensão superficial de uma substância.

$$\Delta G_{sWS}^{LW} = -2\sqrt{\gamma_s^{LW} - \gamma_w^{LW}} \quad (1.35)$$

$$\Delta G_{sWS}^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_s^-}\right) \quad (1.36)$$

Os componentes da tensão interfacial das superfícies e dos líquidos nas condições avaliadas foram determinados pela Equação 1.37, sendo θ , o ângulo formado entre a superfície e o líquido.

$$(1 + \cos \theta) \gamma_l = 2\left(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+}\right) \quad (1.37)$$

Para se determinar as três componentes da tensão interfacial das superfícies, presente na Equação 1.37, determinou-se o ângulo de contato formado por três líquidos de polaridades diferentes. Com os valores contidos na Tabela 1.1 e aplicando a Equação 1.37 para cada um dos líquidos usados, chegou-se ao seguinte sistema de equações, descritos pelas Equações 1.38, 1.39 e 1.40.

$$\gamma_s^{LW} = 11,1(1 + \cos \theta_B)^2 \quad (1.38)$$

$$5,049\left(\sqrt{\gamma_s^+} + \sqrt{\gamma_s^-}\right) = 36,4(1 + \cos \theta_w) - 15,55(1 + \cos \theta_B) \quad (1.39)$$

$$6,293\sqrt{\gamma_s^+} + 1,510\sqrt{\gamma_s^-} = 29(1 + \cos \theta_F) - 20,806(1 + \cos \theta_B) \quad (1.40)$$

Tabela 1.1 - Componentes da tensão interfacial de líquidos de diferentes polaridades a 25°C

Líquido	Tensão Interfacial (mJ·m ⁻²)			
	γ_l^{tot}	γ_l^{LW}	γ_l^+	γ_l^-
α -bromonaftaleno	44,40	44,40	0,00	0,00
Água	72,80	21,80	25,50	25,50
Formamida	58,00	39,00	2,28	39,60

Pela resolução deste sistema de três equações (1.38, 1.39 e 1.40), determina-se as três componentes da tensão interfacial da superfície γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^- para calcular a tensão interfacial global de uma superfície (s), γ_s^{tot} . A partir dos valores das componentes da tensão interfacial, foi possível determinar a ($\Delta G_{adesão}$) entre as duas superfícies: célula microbiana (b) e superfícies de processamento (s):

$$\gamma_{bs} = \gamma_{bs}^{LW} + \gamma_{bs}^{AB} \quad (1.41)$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_b^{LW} + \gamma_s^{LW} - 2\sqrt{\gamma_b^{LW}\gamma_s^{LW}} \quad (1.42)$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_b^+\gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^+\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_s^+\gamma_b^-}\right) \quad (1.43)$$

em que γ_{bs} é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/superfície de adesão; γ_{bs}^{LW} é a componente apolar, interação de Lifshitz-van der Waals entre bactéria e superfície; γ_{bs}^{AB} é a componente polar (interação de ácido base de Lewis) entre bactéria e superfície e γ^+ refere-se ao parâmetro receptor de elétrons e γ^- refere-se ao parâmetro doador de elétrons da tensão superficial de uma substância.

As mesmas equações (1.41, 1.42 e 1.43) foram empregadas no cálculo da tensão interfacial entre as superfícies bactéria/líquido γ_{bl} e tensão interfacial entre a superfície de adesão/líquido γ_{sl}

Como a energia livre está diretamente relacionada à tensão interfacial, o valor do $\Delta G_{adesão}$ mostrado na Equação 1.44, pode ser determinado pela contribuição da componente apolar da tensão interfacial (Equação 1.45) e pelas componentes polares da tensão interfacial entre bactéria, superfície e o líquido, Equação 1.46.

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{bls}^{LW} + \Delta G_{bls}^{AB} \quad (1.44)$$

$$\Delta G_{bls}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} \quad (1.45)$$

$$\Delta G_{bls}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} \quad (1.46)$$

O valor de $\Delta G_{adesão}$ permite fazer uma avaliação termodinâmica do processo de adesão, sendo esta termodinamicamente favorável quando $\Delta G_{adesão} < 0$.

2.7 Análise estatística

Os parâmetros cinéticos dos modelos Monod, Logístico e Luedeking-Piret foram estimados por meio de regressão não linear e minimização do erro quadrático no *software Excel*[®]. Avaliou-se a significância das diferenças de crescimento e adesão entre as culturas utilizando o *software Statistica*. A qualidade do ajuste foi avaliada considerando o coeficiente de determinação (R^2) e a raiz do erro quadrático médio ($RMSE$) entre os dados observados e o resultado predito pelo modelo conforme sugerido por De Cesare et al. (2018) para análise da qualidade de modelos, conforme mostrado nas Equações 1.47 e 1.48.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (1.47)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2} \quad (1.48)$$

$$\text{sendo } \bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Modelagem cinética

Os valores dos parâmetros estimados pelo ajuste do modelo de Luedeking-Piret combinado com modelo logístico de crescimento e para o ajuste do modelo de Luedeking-Piret combinado com modelo de Monod são apresentados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Parâmetros cinéticos do cultivo de *L. innocua* e *P. fluorescens* na temperatura ótima de cultivo e sob refrigeração para o modelo Logístico e Monod.

Modelo	Parâmetros	Temperatura			
		4°C		<i>T</i> _{ótima}	
		<i>L. innocua</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>L. innocua</i>	<i>P. fluorescens</i>
Logístico	α	0,22	-	0,46	0,79
	β	0,01	-	0,01	0,00
	R^2	0,94	-	0,90	0,99
	$RMSE$	1,20	-	1,66	0,30
	μ_{max} [h ⁻¹]	0,13	0,00	0,75	0,10
	t_{lag} [h]	1,38	24	0,00	4,50
	K	9,12	-	7,92	8,99
	R^2	0,89	-	0,98	0,94
	$RMSE$	1,86	-	0,70	1,10
Monod	α	2,18	-	1,47	0,61
	β	0,06	-	-0,02	-0,01
	R^2	0,98	-	0,89	0,92
	$RMSE$	0,65	-	1,80	0,61
	μ_{max}	0,04	0,00	0,75	0,04
	t_{lag} [h]	6,0	24	0,00	4,00
	R^2	0,90	-	0,98	0,97
	$RMSE$	7,67	-	1,22	9,16

Em ambas as estimações, notou-se que o parâmetro α foi expressivamente superior ao β na equação de Luedeking-Piret, independentemente do modelo cinético usado para descrever o crescimento celular. Esse resultado indicou que a evolução da adesão microbiana na superfície do aço inoxidável é majoritariamente governada pela taxa de crescimento dos microrganismos no meio. Dessa forma, para o fenômeno de adesão das células microbianas à superfície de aço inoxidável é necessário haver aumento no número de células.

Segundo Flemming et al. (2016), à medida que ocorre o aumento na taxa de crescimento das células aderidas há aumento na densidade celular, gerando o sistema complexo denominado de biofilme que tipicamente compreendem muitas espécies. Associado ao crescimento, há a síntese de substâncias poliméricas extracelulares, as quais estabilizam o sistema (EL-KIRAT-CHATEL et al., 2020). Essas substâncias proporcionam proteção às células conferindo características, como o *Quórum Sensing*, resistência aos agentes antimicrobianos e adaptação na estrutura celular (FLEMMING e WUERTZ, 2019; FLEMMING et al., 2016)

Outro parâmetro cinético avaliado foi a velocidade específica máxima. As células de *L. innocua* apresentaram maior velocidade específica de crescimento em ambas as temperaturas estudadas. Além disso, no crescimento de *L. innocua*, observou-se que a 37°C a velocidade específica foi maior do que sob refrigeração a 4°C. Já *P. fluorescens* não apresentou crescimento sob refrigeração, apenas manutenção no número de células.

Jia et al. (2021) estudaram o desenvolvimento de *L. monocytogenes* empregando modelo cinético para prever o crescimento das células em leite de vaca pasteurizado e armazenado a 4°C. No estudo, os autores encontram velocidade específica de crescimento de aproximadamente 0,14 h⁻¹, similar ao resultado encontrado no modelo cinético logístico. Essa taxa de crescimento específico de *L. monocytogenes* calculada a partir do modelo desenvolvido também está em concordância com os relatados por Novyanti et al. (2020).

Na temperatura de 37°C a velocidade específica de crescimento de *L. monocytogenes* foi de 1,07 a 1,11 h⁻¹ no leite cru e no leite pasteurizado respectivamente nos estudos cinéticos realizado por Lima et al. (2021). Notavelmente, a velocidade específica do microrganismo aumentou em função da temperatura.

Na Figura 1.1 é apresentada a curva de crescimento de *L. innocua* ao longo de 24 h de cultivo a 4°C, ou seja, sob condições usuais de refrigeração. Nota-se, inicialmente, uma fase *lag* de aproximadamente 10 h. Segundo Tortora (2012), nessa fase há intensa atividade de preparação para o crescimento populacional, mas sem aumento real do número de células na população. No entanto, as células não estão dormentes e há intensa atividade metabólica, envolvendo principalmente a síntese de enzimas e várias moléculas.

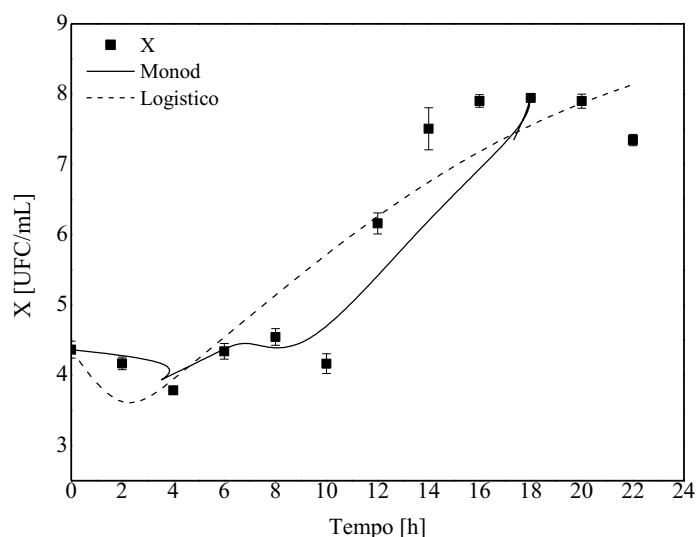


Figura 1.1 – Multiplicação de *L. innocua* ao longo de 24 h de cultivo a 4°C e ajuste cinético dos modelos.

Em seguida, por volta das 8 h de incubação ocorre o aumento real no número de células no meio. Nessa fase, as células começam a se dividir e entram em um período de crescimento e aumento exponencial, denominada fase log ou fase exponencial do crescimento. Na fase log, a reprodução celular é mais ativa e o tempo de geração atinge um valor constante. Como o tempo de geração é constante, uma representação logarítmica do crescimento durante a fase log gera uma linha reta. A fase log é o momento de maior atividade metabólica, sendo a fase mais comprometedora para a qualidade microbiológica dos alimentos.

Na Figura 1.2 é apresentado o desenvolvimento da adesão das células de *L. innocua* ao longo do tempo em condições de refrigeração a 4°C. Nota-se que, nas primeiras 10 h de incubação, a contagem de células na superfície é praticamente constante. Após esse período de 10 h, ocorreu o aumento no número de células aderidas à superfície. Esse aumento está associado ao crescimento e multiplicação no número de células no meio,

conforme mostrado na Figura 1.1. Por último, quando o tamanho da população entra na fase estacionária Fig. 1.1, observou-se que não houve aumento significativo no número de células na superfície dos cupons de aço inoxidável, conforme mostrado na Fig. 1.2.

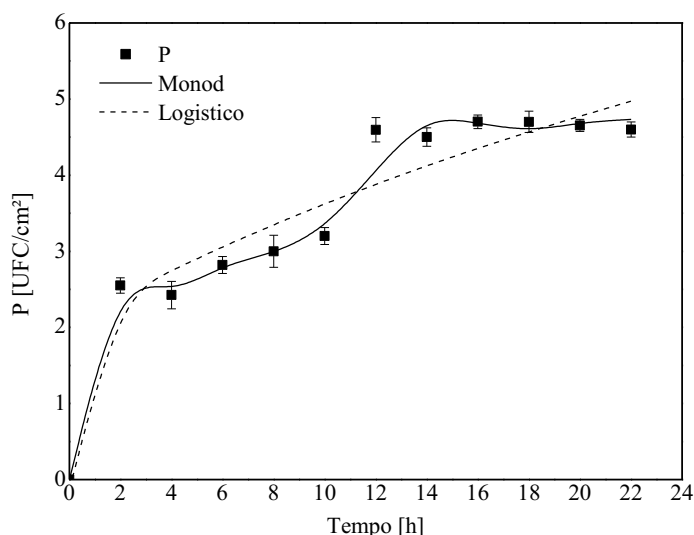


Figura 1.2 – Adesão de *L. innocua* na superfície de aço inox ao longo de 24 h de cultivo a 4°C e ajuste cinético dos modelos.

A Figura 1.3 mostra a evolução no crescimento de *L. innocua* no leite a 37°C. Observou-se que nessa condição não houve a fase lag. Após aproximadamente 8 h, atingiu cerca de $8,02 \pm 0,08 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Nota-se a boa adequação de ambos os modelos cinéticos de crescimento aos dados experimentais.

Observou-se que a curva de crescimento de *L. innocua* não exibiu fase lag como ocorrido com *P. fluorescens*. Isso sugere que, durante cerca de 4 h, o número de células de *P. fluorescens* mudou pouco, sem reprodução imediata. Nesse período, entende-se que os microrganismos ao serem retirados do BHI e inseridas no leite passaram por uma fase adaptação de atividade metabólica no novo meio. Diferentemente de *Listeria innocua* que apresentou aumento exponencial já nos instantes iniciais da contaminação.

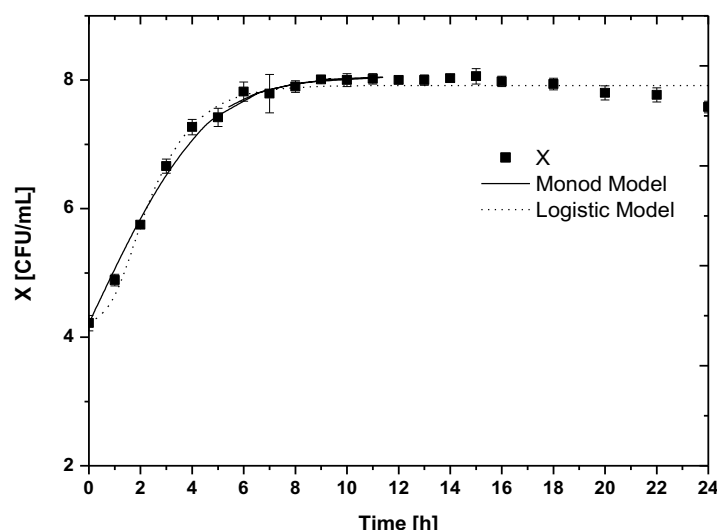


Figura 1.3 - Multiplicação de *L. innocua* ao longo de 24 h de cultivo a 37°C e ajuste cinético dos modelos.

Na Figura 1.4 são apresentados o comportamento e o avanço do número de unidades formadoras de colônia por cm^2 de *L. innocua* na superfície de aço inoxidável ao longo do tempo, juntamente com o ajuste dos modelos cinéticos. O nível de adesão deste microrganismo na superfície foi em média $4,81 \pm 0,11 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. É possível observar ainda a adequação dos modelos aos resultados experimentais, tanto do modelo de crescimento Logístico quanto do modelo de Monod.

Além disso, é possível notar o aumento no número de células aderidas à superfície nas primeiras horas de incubação, comportamento associado à evolução das células no meio da matriz alimentícia (Fig. 1.3). Em aproximadamente 8 h de incubação foi possível notar que o crescimento atinge a fase estacionária, não ocorrendo aumento significativo no número de células e esse comportamento se estende para a tendência de adesão, ou seja, após 8 h não houve aumento líquido no número de células aderidas à superfície, evidenciando um fenômeno associado ao crescimento das células.

Casarin et al. (2016) estudaram a adesão de *L. monocytogenes* sobre o aço inoxidável e observaram que após 1 h de contato houve contaminação média de $1,68 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ e após 8 h de contato a contaminação na superfície alcançou em média $3,60 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, similar aos valores encontrados neste trabalho. Já os pesquisadores Gu et al. (2021) estudaram a adesão de *L. monocytogenes* sobre aço inoxidável #4 após 24 h de contato a temperatura de 37°C e encontraram nível de contaminação para superfície de aproximadamente $5,5 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$.

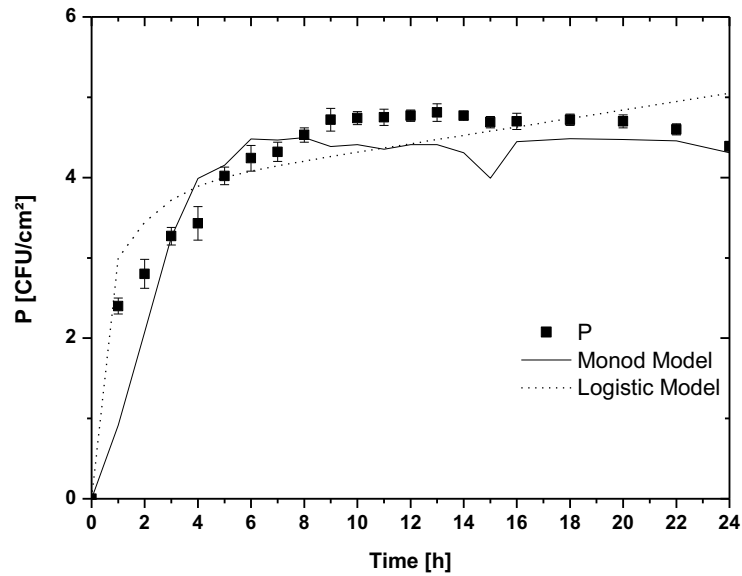


Figura 1.4 - Adesão de *L. innocua* na superfície de aço inoxidável ao longo de 24 h de cultivo a 37°C e ajuste cinético dos modelos.

Na Figura 1.5 foi apresentada a curva de crescimento das células de *P. fluorescens* ao longo das 24 h sob refrigeração a 4°C. Durante o período de refrigeração, não se observou aumento significativo na quantidade de células, mantendo a contagem em média de $4,42 \pm 0,26 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$.

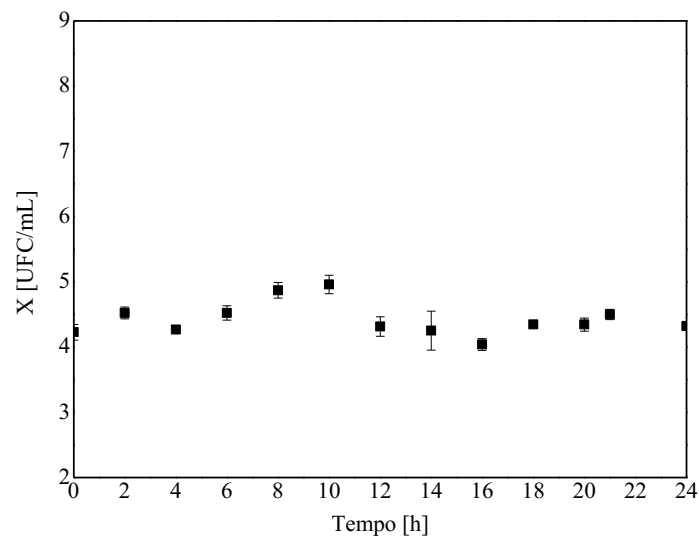


Figura 1.5 – Multiplicação de *P. fluorescens* ao longo de 24 h de cultivo a 4°C e ajuste cinético dos modelos.

De forma similar à contagem de células planctônicas no meio mantido sob refrigeração a 4°C, o número de células aderidas à superfície manteve-se praticamente constante, não apresentando diferença significativa entre as primeiras horas de incubação

até ao final do período estudado, conforme mostrado na Figura 1.6. Isso evidencia que sem o crescimento de célula no meio não houve desenvolvimento do número de células aderidas na superfície.

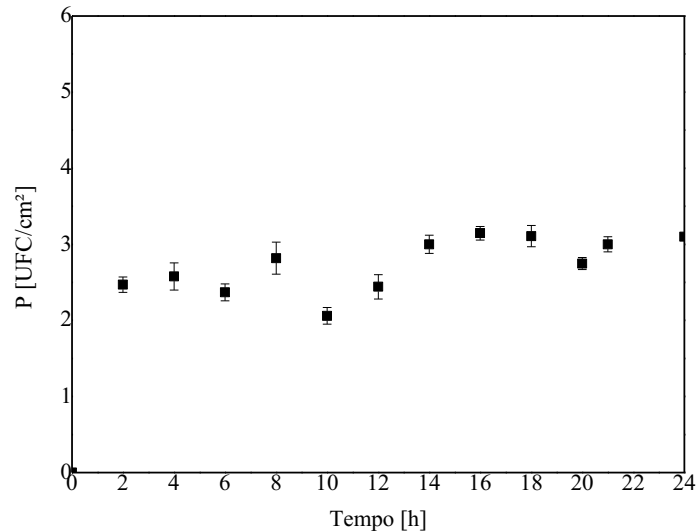


Figura 1.6 - Adesão de *P. fluorescens* na superfície de aço inoxidável ao longo de 24 h de cultivo a 4°C e ajuste cinético dos modelos.

Na Figura 1.7 foi apresentada a evolução do crescimento de *P. fluorescens* incubada em leite ao longo de 24 h a 26°C. Inicialmente, observa-se uma fase *lag*, com quantia constante de células. No leite, a contaminação atingiu $7,88 \pm 0,11 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Nota-se a boa aderência dos modelos cinéticos de crescimento aos dados experimentais.

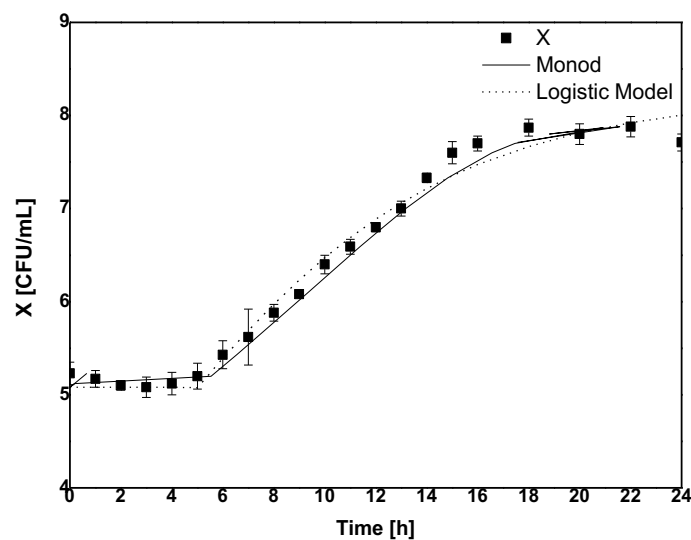


Figura 1.7 – Multiplicação de *P. fluorescens* ao longo de 24 h de cultivo a 26°C e ajuste cinético dos modelos.

A Figura 1.8 apresenta o avanço no número de unidades formadoras de colônia por cm^2 de *P. fluorescens* na superfície de aço inoxidável ao longo do tempo. O nível de adesão deste microrganismo na superfície foi em média $3,87 \pm 0,06 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. É possível observar ainda a adequação dos modelos aos resultados experimentais.

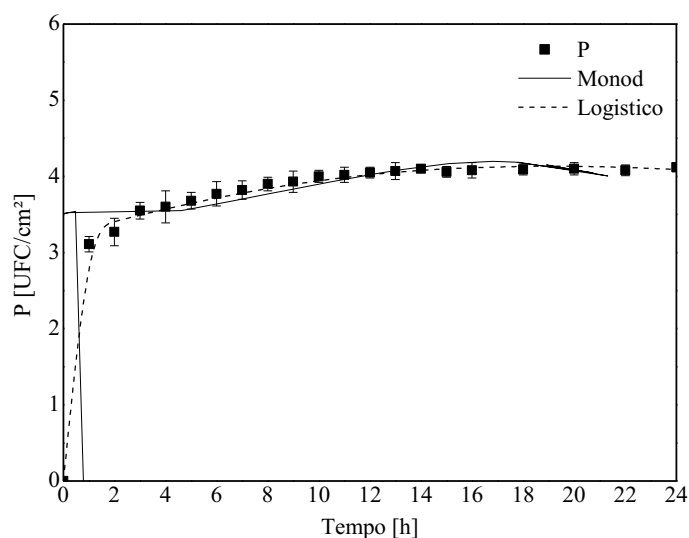


Figura 1.8 – Adesão de *P. fluorescens* na superfície de aço inoxidável ao longo de 24 h de cultivo a 26°C e ajuste cinético dos modelos.

Nesse contexto, notou-se que o nível de contaminação produzido no leite por esses dois microrganismos não foi estatisticamente significativo ($p=0,1492$). Por outro lado, a *L. innocua* apresentou grau de adesão superior a *P. fluorescens* ($p=0,0007$). Mesmo que o gênero *Pseudomonas* spp. seja capaz de produzir exopolissacarídeos, acredita-se que a menor adesão deste microrganismo neste estudo esteja relacionada às questões energéticas da interação, mostrada no item 3.3 com a análise da termodinâmica de adesão das células.

3.2 Compostos da matriz exopolimérica

O espectro ATR-FTIR para análise dos EPS formado sobre o aço inoxidável incubado com *L. innocua* (Fig. 1.9A) e *P. fluorescens* (Fig. 1.9B) foram determinados diretamente nas placas de aço inoxidável após período incubação. Não se evidenciou picos significativos no espectro para presença de EPS na superfície de aço inoxidável contaminado com *L. innocua*, em nenhum dos tempos de contato. No entanto, com 48 h de incubação, Agustín e Brugnoli (2018) mostraram que as células de *Listeria*

monocytogenes e *Listeria innocua* produziram exopolissacarídeos, fato que contribuiu para o processo.

Já a superfície contaminada com *P. fluorescens* apresentou vários compostos indicativos de EPS observados nos espectros para os dois períodos de incubação, 12 e 24 h, não apresentando diferença significativa nos picos do espectro entre esses dois tempos de contato. Lauer Cruz e Souza da Motta (2019) avaliaram o crescimento e a produção de EPS por *P. fluorescens* e também verificaram que após o período de incubação de 24 h houve produção de exopolissacarídeos no meio. Wang et al. (2018); Quiles-Polyakov et al. (2012) mostraram que o gênero *Pseudomonas* spp. tem capacidade de produzir vários componentes poliméricos extracelulares que viabilizam a sustentação das células na superfície e auxiliam na formação do biofilme.

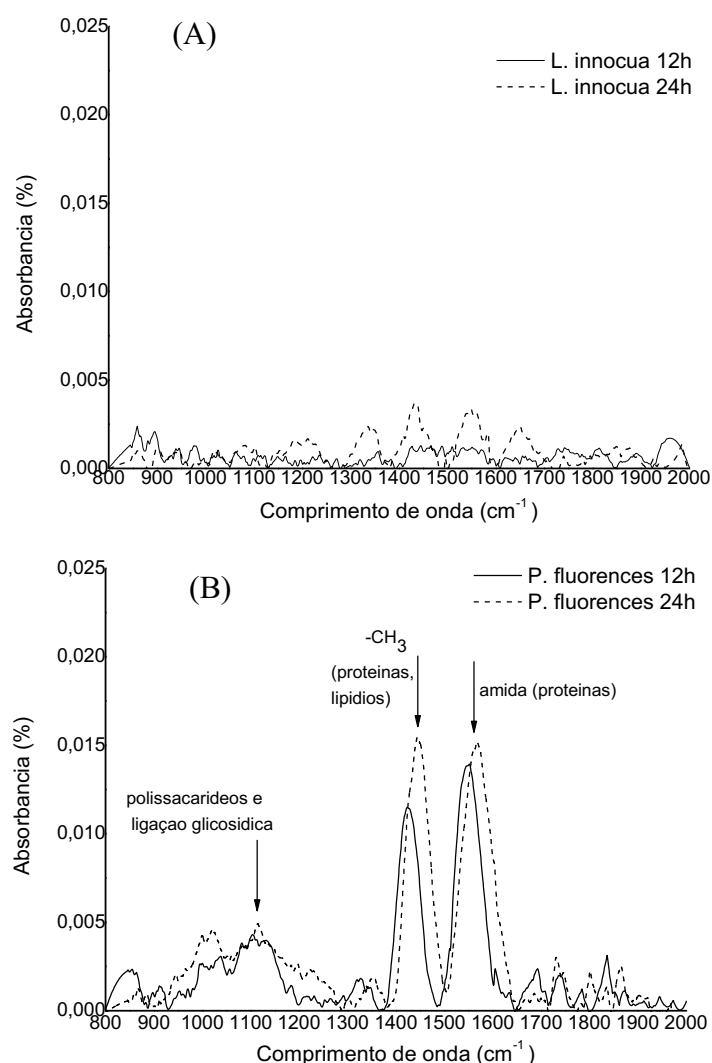


Figura 1.9 - Espectro FTIR para a superfície de aço inoxidável contaminado com *L. innocua* (A) e *P. fluorescens* (B) após 12 e 24 h.

De acordo com esses grupos funcionais associados as bandas principais nos espectros ATR-FTIR (OJEDA et al., 2008), os picos em 1540 cm^{-1} foram atribuídos, respectivamente, aos grupos funcionais amida II, presentes em proteínas e 1055 cm^{-1} polissacarídeos e deformação da ligação glicosídica de carboidratos.

Outros picos, observados em 1455 , 1420 e 1395 cm^{-1} , provavelmente foram associados com flexão C-H de CH_2 (ou CH_3) presente em proteínas e lipídios (TUGAVORA et al., 2017) e alongamento simétrico C=O para grupo COO^- desprotonado e flexão de C-O de COO^- (WANG et al., 2018; DITTRICH e SIBLER, 2005). Esses achados sugeriram que os constituintes do biofilme EPS formados por *P. fluorescens* incluíam principalmente polissacarídeos, proteínas e outros carboidratos.

3.3 Hidrofobicidade das células bacterianas

Na Tabela 1.3 foram apresentadas as medidas dos ângulos de contato com três líquidos de diferentes polaridades para as superfícies do aço inoxidável com *P. fluorescens* e *L. innocua*.

Tabela 1.3 - Valores dos ângulos de contato entre as superfícies do aço inoxidável e das células bacterianas com diferentes líquidos: água, formamida e α -bromonaftaleno.

Superfície	Água [°]	Formamida [°]	α – bromonaftaleno [°]
Aço inoxidável	$62,08 \pm 0,50$	$53,58 \pm 0,26$	$27,34 \pm 0,37$
<i>P. fluorescens</i>	$20,83 \pm 0,92$	$36,99 \pm 1,32$	$31,11 \pm 0,85$
<i>L. innocua</i>	$23,17 \pm 0,35$	$19,11 \pm 0,75$	$32,22 \pm 1,16$

O alto valor do ângulo de contato da água, substância polar, com o aço inoxidável indicou que a superfície tem pouca interação entre as moléculas da superfície do aço inoxidável e a camada de água que solvata esta interface, o que implica na baixa molhabilidade desta superfície. Casarin et al. (2016) relataram ângulo de contato da água com aço inoxidável 304 de $51,7^\circ \pm 7,0^\circ$, valor semelhante ao encontrado neste estudo. Deleplace et al. (2022) também relataram resultados similares do ângulo de contato da água com o aço inoxidável no estudo da hidrofobicidade no qual encontraram ângulo de $49,9 \pm 2,6$. Hua et al. (2021) concluíram que o maior ângulo de contato da água com a superfície de aço inoxidável representa a maior hidrofobicidade e menor molhabilidade.

A Tabela 1.4 mostra os resultados da variação da energia livre de interação hidrofóbica ΔG_{sas}^{TOT} obtido através do ângulo de contato. Com base nesse resultado, a superfície foi considerada hidrofóbica já que apresentou ΔG_{sas}^{TOT} negativo. Torqueti et al. (2019) apresentaram valor de ΔG_{sas}^{TOT} igual a $-20,89 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ para o aço inoxidável, similar ao resultado deste trabalho. Os autores também classificaram a superfície como hidrofóbica.

Tabela 1.4.-Valores dos componentes apolares $\Delta G_{sas}^{LW} (\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$ e polares $\Delta G_{sas}^{AB} (\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$ da energia livre total de interação da superfície e células bacterianas.

Superfície	$\Delta G_{sas}^{LW} (\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$	$\Delta G_{sas}^{AB} (\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$	$\Delta G_{sas}^{TOT} (\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$
Aço inoxidável	-5,26	-14,08	-19,34
<i>P. fluorescens</i>	-4,59	56,88	52,29
<i>L. innocua</i>	-4,39	29,61	25,23

Em relação às espécies bacterianas, ambas foram consideradas hidrofílicas tanto pelo baixo valor do ângulo de contato com a água ($< 50^\circ$) quanto pelo valor de ΔG_{sas}^{TOT} maior que zero (Tabelas 1.4), sendo a espécie *P. fluorescens* mais hidrofílica em comparação à *L. innocua*. Scalabrini et al. (2019) estudaram o gênero *Pseudomonas aeruginosa* e concluíram que essa apresentava caráter hidrofílico com um valor de ângulo de contato com a água de $26^\circ \pm 2^\circ$. Chafsey et al. (2022) estudaram a caracterização e propriedades superficiais das células de *L. monocytogenes* e encontraram energia livre de Gibbs igual a $23,7 \pm 0,4 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ e concluíram que essa espécie foi hidrofílica, resultado similar ao relatado neste trabalho.

A energia livre de adesão entre a bactéria e a superfície de aço inoxidável em meio aquoso foi calculado a fim de prever qual a superfície possui maior capacidade para a formação de biofilmes. A diferença entre o grau de adesão dos microrganismos após o período de incubação pode ser parcialmente explicada pela variação na energia livre de Gibbs, conforme mostrado na Tabela 1.5.

Tabela 1.5 - Energia livre de adesão ($\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$) entre diferentes espécies bacterianas e a interação com a superfície de aço inoxidável.

Superfície	$\Delta G_{bls}^{LW} (\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$	$\Delta G_{bls}^{AB} (\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$	$\Delta G_{adesão} (\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$
<i>P. fluorescens</i> – aço	-4,91	11,15	6,23
<i>L. innocua</i> – aço	-4,81	6,65	1,84

Para se estabelecer o contato entre a superfície celular e superfície de aço inoxidável, o filme de água que reveste deve ser removido. Assim, as duas superfícies bacterianas foram classificadas como hidrofílicas, o que implica em uma camada de água interagindo fortemente com ambas as superfícies o que dificulta a remoção. Portanto, há um gasto energético para a dessolvatação da interface bacteriana, a adesão e consequente formação de biofilmes. No entanto, o gasto energético para ocorrer a dessolvatação e adesão das células de *P. fluorescens* é superior comparado a *L. innocua*, o que ajuda a justificar o maior número de células de *L. innocua* na superfície do aço inoxidável.

Deve-se destacar ainda que há outros fatores além dos aspectos cinéticos e termodinâmicos que influenciam no processo de adesão das bactérias à superfície. A presença de apêndices celulares, como frímbricas, pili, a própria síntese de EPS e o *Quorum Sensing* são fatores que participam do mecanismo de adesão e são capazes de sobrepor a repulsão eletrostática entre as superfícies e facilitar a adesão conforme relatado por Berne et al. (2018) e Yu e Shi (2021).

Além disso, mesmo que um determinado gênero bacteriano não sintetize exopolissacarídeos dentro do período de avaliação e limpeza do sistema de processamento pode ocorrer a fixação das células. Kocot e Olszewska (2020) estudaram a interação entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria innocua* mostrando que, na prática, os biofilmes são muitas vezes compostos de várias espécies em co-cultura gerando, assim, um efeito sinérgico que contribui para a resistência das células frente às agressões ambientais, físicas e químicas.

4. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de dois gêneros de microrganismos, *Listeria innocua* e *Pseudomonas fluorescens*, foi avaliado neste trabalho e os respectivos aspectos cinéticos e termodinâmicos relacionados ao fenômeno de adesão e formação de biofilme. Notou-se que o desenvolvimento do fenômeno de adesão das células microbianas foi associado à taxa de crescimento de ambos os microrganismos. *Listeria innocua* apresentou maior velocidade específica de crescimento superior às células de *P. fluorescens* nas duas temperaturas estudadas e também maior capacidade de adesão à superfície de aço inoxidável. As células de *L. innocua* não produziram EPS durante o período usual de operação da indústria de laticínios. No entanto, *P. fluorescens* foi capaz de produzir matriz exopolimérica desde as 12 h de incubação a qual foi evidenciada pela análise do FTIR. Do ponto de vista termodinâmico, ambas os gêneros foram considerados hidrofílicos, sendo a *Listeria innocua* mais favorável energeticamente à adesão na superfície de aço inoxidável, com base na energia livre de Gibbs.

5. REFERÊNCIAS

- Agustín, M. D. R., & Brugnoli, L. (2018). Multispecies biofilms between *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* with resident microbiota isolated from apple juice processing equipment. *Journal of Food Safety*, 38(5), e12499. <https://doi.org/10.1111/jfs.12499>
- Bastos, R. G. Tecnologia das Fermentações: Fundamentos de Bioprocessos. EdUFSCar, 2010, 162 p.
- Berne, C., Ellison, C. K., Ducret, A., & Brun, Y. V. (2018). Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nature Reviews Microbiology*, 16(10), 616–627. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0057-5>
- Busscher, H. J.; Weerkamp, A. H.; Van D. E. R, Mei H. C.; Van Pelt, A. W.; De Jong, H. P.; Arends, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 48, p. 980-983, 1984.
- Casarin, L. S., Casarin, F. D. O., Brandelli, A., Novello, J., Ferreira, S. O., & Tondo, E. C. (2016). Influence of free energy on the attachment of *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on stainless steels AISI 304 and AISI 316. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.035>

Chafsey, I., Ostrowski, R., Guilbaud, M., Teixeira, P., Herry, J. M., Caccia, N., Chambon, C., Hébraud, M., Azeredo, J., Bellon-Fontaine, M. N., Popowska, M., & Desvaux, M. (2022). Deep impact of the inactivation of the SecA2-only protein export pathway on the proteosurfaceome of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Proteomics*, 250, 104388. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104388>

Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M., & Bernardi, T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 605–612. <http://doi:10.1016/j.mimet.2006.11.010>

Caixeta, D. S., Scarpa, T. H., Brugnera, D. F., Freire, D. O., Alves, E., Abreu, L. R. D., & Piccoli, R. H. (2012). Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. *Food Science and Technology*, 32(1), 142–150. <http://doi:10.1590/s0101-20612012005000008>

Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556. <http://doi:10.1016/j.foodres.2011.11.004>

Costerton, J. W. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <http://doi:10.1126/science.284.5418.1318>

Cornu, M., Kalmokoff, M., & Flandrois, J.-P. (2002). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3), 261–274. [http://doi:10.1016/s0168-1605\(01\)00658-4](http://doi:10.1016/s0168-1605(01)00658-4)

De Cesare, A., Vitali, S., Tessema, G. T., Trevisani, M., Fagereng, T. M., Beaufort, A., ... Skjerdal, T. (2018). Modelling the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in pasta salads at different storage temperatures and packaging conditions. *Food Microbiology*, 76, 154–163. <http://doi:10.1016/j.fm.2018.04.013>

Deleplace, M., Dallagi, H., Dubois, T., Richard, E., Ipatova, A., Bénézech, T., & Faille, C. (2022). Structure of deposits formed by drying of droplets contaminated with *Bacillus* spores determines their resistance to rinsing and cleaning. *Journal of Food Engineering*, 318, 110873. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110873>

Dittrich, M., & Sibling, S. (2005). Cell surface groups of two picocyanobacteria strains studied by zeta potential investigations, potentiometric titration, and infrared spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 286(2), 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.01.029>

Dong, Y., Yan, X., Lu, F., Guo, M., Zhuang, Y., (2015). Development and Optimization of an Unstructured Kinetic Model for Sodium Gluconate Fermentation Process. *Comput. Mater. Continua* 48 (1), 43–55. <https://doi:10.3970/cmc.2015.048.043>

El-Kirat-Chatel, S., Beaussart, A., Mathelié-Guinlet, M., & Dufrêne, Y. F. (2020). The importance of force in microbial cell adhesion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 47, 111–117. <http://doi:10.1016/j.cocis.2019.12.010>

Figueiredo, H. M. de, Andrade, N. J. de, Ozela, E. F., & Morales, G. P. (2009). Influência da velocidade de circulação do leite na adesão de *Pseudomonas aeruginosa* sobre aço inoxidável. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(3), 469–473. <http://doi:10.1590/s0101-20612009000300002>

Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <http://doi:10.1038/nrmicro.2016.94>

Flemming, H.-C., & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 247–260. <http://doi:10.1038/s41579-019-0158-9>

Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>

Hua, Z., Younce, F., Tang, J., Ryu, D., Rasco, B., Hanrahan, I., & Zhu, M. J. (2021). Efficacy of saturated steam against *Listeria innocua* biofilm on common food-contact surfaces. *Food Control*, 125, 107988. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107988>

Huang, L. (2008). Growth Kinetics of *Listeria monocytogenes* in Broth and Beef Frankfurters—Determination of Lag Phase Duration and Exponential Growth Rate under Isothermal Conditions. *Journal of Food Science*, 73(5), E235–E242. <http://doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00785.x>

Garnier, A., & Gaillet, B. (2015). Analytical solution of Luedeking-Piret equation for a batch fermentation obeying Monod growth kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(12), 2468–2474. <http://doi:10.1002/bit.25669>

Gomes M. C. Predação. Interações entre espécies. Introdução aos Modelos Biomatemáticos. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa. 2003.

Gu, T., Meesrisom, A., Luo, Y., Dinh, Q. N., Lin, S., Yang, M., Sharma, A., Tang, R., Zhang, J., Jia, Z., Millner, P. D., Pearlstein, A. J., & Zhang, B. (2021). *Listeria monocytogenes* biofilm formation as affected by stainless steel surface topography and coating composition. *Food Control*, 130, 108275. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108275>

Jia, Z., Huang, L., Wei, Z., Yao, Y., Fang, T., & Li, C. (2021). Dynamic kinetic analysis of growth of *Listeria monocytogenes* in pasteurized cow milk. *Journal of Dairy Science*, 104(3), 2654–2667. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19442>

Kocot, A. M., & Olszewska, M. A. (2020). Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with *Listeria innocua* in dual species biofilms and inactivation following disinfectant treatments. *LWT*, 118, 108736. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108736>

Lauer Cruz, K., & de Souza da Motta, A. (2019). Characterization of biofilm production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw buffalo milk.

Journal of Food Science and Technology, 56(10), 4595–4604.
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03924-1>

Leite, M. T. Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus*. Tese de doutorado. 179p. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2006.

Lima, J. S., Sampaio, A. P. P. O., Dufossé, M. C. da S., Sousa, P. F. M. de, Silva, J. B. da, Moraes, C. M. de, & Roos, T. B. (2021). Growth kinetics of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in buffalo milk under different processing and storage conditions. *Ciência Rural*, 51(11). <http://doi:10.1590/0103-8478cr20200967>

Muloiwa, M., Nyende-Byakika, S., & Dinka, M. (2020). Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. *South African Journal of Chemical Engineering*, 33, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.07.006>

Noviyanti, F., Shimizu, S., Hosotani, Y., Koseki, S., Inatsu, Y., & Kawasaki, S. (2020). Predictive Growth Model of *Listeria monocytogenes* Under Fluctuating Temperature Conditions in Pasteurized Milk by Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(11), 693–700. <http://doi:10.1089/fpd.2020.2793>

Ojeda, J. J., Romero-González, M. E., Bachmann, R. T., Edyvean, R. G. J., & Banwart, S. A. (2008). Characterization of the Cell Surface and Cell Wall Chemistry of Drinking Water Bacteria by Combining XPS, FTIR Spectroscopy, Modeling, and Potentiometric Titrations. *Langmuir*, 24(8), 4032–4040. <https://doi.org/10.1021/la702284b>

Oliveira MMM, Brugnera DF, Piccoli RH (2010) Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: Uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz* 69:277–284.

Parizzi, S. Q. F., Andrade, N. J. de, Silva, C. A. de S., Soares, N. de F. F., & Silva, E. A. M. da. (2004). Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(1), 77–83. <http://doi:10.1590/s1516-89132004000100011>

Quilès, F., Polyakov, P., Humbert, F., & Francius, G. (2012). Production of Extracellular Glycogen by *Pseudomonas fluorescens*: Spectroscopic Evidence and Conformational Analysis by Biomolecular Recognition. *Biomacromolecules*, 13(7), 2118–2127. <http://doi:10.1021/bm300497c>

Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Goffredo, E., Cenci Goga, B. T., & Paparella, A. (2016). Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. *Italian Journal of Food Safety*, 5(3). <http://doi:10.4081/ijfs.2016.5793>

Scalabrini, M., Hamon, J., Linossier, I., Ferrières, V., & Réhel, K. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* resistance of monosaccharide-functionalized glass surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 183, 110383. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110383>

Silva, I. D., Careli, R. T., Lima, J. C., & Andrade, N. J. (2010). Effectiveness of cleaning and sanitizing procedures in controlling the adherence of *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Enteritidis*, and *Staphylococcus aureus* to domestic kitchen surfaces. *Food Science and Technology*, 30(1), 231–236. <http://doi:10.1590/s0101-20612010005000015>

Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.001>

Su, Y., Jiang, L., Chen, D., Yu, H., Yang, F., Guo, Y., Xie, Y., & Yao, W. (2022). In vitro and in silico approaches to investigate antimicrobial and biofilm removal efficacies of combined ultrasonic and mild thermal treatment against *Pseudomonas fluorescens*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 83, 105930. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105930>

Toloi Torqueti, F., Lino Freitas, G., Carneiro Ferreira, D., Valetim Gelamo, R., Dias dos Anjos Gonçalves, L., & Anadrade Araújo Naves, E. (2019). Stainless steel surface functionalized with silver by cathodic sputtering. *Journal of Food Safety*, 39(5). <http://doi:10.1111/jfs.12668>

Tugarova, A. V., Scheludko, A. V., Dyatlova, Y. A., Filip'echeva, Y. A., & Kamnev, A. A. (2017). FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610. *Journal of Molecular Structure*, 1140, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.063>

van OSS, C. J. *Interfacial forces in aqueous media*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994. 440 p

Wang, H., Cai, L., Li, Y., Xu, X., & Zhou, G. (2018). Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants. *Food Control*, 91, 397–403. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2018.04.035>

Yu, L., & Shi, H. (2021). Recent advances in anti-adhesion mechanism of natural antimicrobial agents on fresh produce. *Current Opinion in Food Science*, 42, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.009>

CAPÍTULO II - HIGIENIZAÇÃO *CLEAN IN PLACE* (CIP): EFEITOS DA GEOMETRIA, DO MICRORGANISMO E ASPECTOS FLUIDODINÂMICOS

RESUMO: A higienização *clean in place* (CIP) é uma das técnicas mais comumente empregadas na limpeza e sanitização de equipamentos e tubulações na indústria de alimentos e fármacos. No entanto, alguns pontos nas tubulações são desafiadores em função da geometria do sistema e da fluidodinâmica dos agentes de limpeza. Este capítulo avaliou a higienização de cinco geometrias: trecho cilíndrico reto, ramificação em tê, curva 90°, expansão e redução de diâmetro, contaminadas com dois microrganismos diferentes: *Listeria innocua* e *Pseudomonas fluorescens*. Além disso, investigou o comportamento fluidodinâmico do escoamento em termos da velocidade e da tensão de cisalhamento no interior dessas geometrias. Para isso, foi empregado uma linha de circulação com as mesmas características daquelas encontradas nas indústrias lácteas, feita em aço inoxidável 304, polimento #4, com instrumentos de medida e controle do processo. As geometrias foram contaminadas com leite integral UHT, previamente esterilizado, inoculado com os microrganismos para o processo de adesão. Em seguida, as geometrias foram higienizadas e a amostragem realizada pela técnica de *swab* e o desempenho da higienização foi avaliado com base no número de reduções decimais no quantitativo de células e na contagem final de células na superfície de cada geometria. Na análise estatística empregou-se o teste de Duncan para avaliar a diferença entre as reduções decimais na contagem de células para cada geometria e em função do microrganismo comparativamente. O estudo fluidodinâmico foi realizado com *software* FLUENT versão *Student* e o consumo energético foi determinado por meio de sensor de corrente elétrica. Os resultados mostraram que *L. innocua* alcançou níveis de adesão maiores que *P. fluorescens* durante o tempo usual de operação da indústria. A redução decimal na sanitização tradicional, com fluxo constante mostrou que o trecho cilíndrico reto e a redução foram as geometrias que tiveram melhores níveis de higienização em detrimento da ramificação em tê, que apresentou a menor redução decimal de células, para os dois microrganismos, em função da formação de zonas de estagnação e recirculação de fluido, observadas na simulação fluidodinâmica. Em termos de contagem de células, todas as geometrias foram consideradas higienizadas para os dois microrganismos estudados, exceto a geometria tê que ainda apresentou contagem superior ao recomendado. Observou-se que a etapa de limpeza e sanitização foram as que mais demandaram energia para execução do processo de higienização CIP.

Palavras-chave: Segurança microbiológica; Bactérias Psicotróficas, Adesão microbiana, Zonas de estagnação.

ABSTRACT: Clean in place (CIP) hygienization is one of the most commonly used techniques for cleaning and sanitizing equipment and piping in the food and pharmaceutical industry. However, some points in the pipes are challenging due to the geometry of the system and the fluid dynamics of the cleaning agents. This work evaluated the hygiene of five geometries: straight cylindrical section, tee branching, 90° curve, expansion and diameter reduction, contaminated with two different microorganisms: *Listeria innocua* and *Pseudomonas fluorescens*. Furthermore, he investigated the fluid dynamic behavior of the flow in terms of velocity and shear stress within these geometries. For this, a circulation line was used with the same characteristics as those found in the dairy industries, made of stainless steel 304, polishing #4, with instruments for measuring and controlling the process. The geometries were contaminated with UHT whole milk, previously sterilized, inoculated with the microorganisms for the adhesion process. Then, the geometries were sanitized and the sampling performed using the swab technique and the cleaning performance was evaluated based on the number of decimal reductions in the number of cells and the final cell count on the surface of each geometry. In the statistical analysis, Duncan's test was used to evaluate the difference between the decimal reductions in the cell count for each geometry and as a function of the microorganism comparatively. The fluid dynamic study was carried out using FLUENT software, Student version, and energy consumption was determined using an electric current sensor. The results showed that *L. innocua* achieved higher adhesion levels than *P. fluorescens* during the usual industry operating time. The decimal reduction in traditional sanitization, with constant flow, showed that the straight cylindrical section and the reduction were the geometries that had better levels of sanitization, to the detriment of the tee branching, which presented the lowest decimal reduction of cells, for both microorganisms, in function of the formation of stagnation zones and fluid recirculation, observed in the fluid dynamic simulation. In terms of cell count, all geometries were considered sanitized for the two microorganisms studied, except for the tee geometry, which still had a higher count than recommended. It was observed that the cleaning and sanitization step required the most energy to carry out the CIP sanitization process.

Keywords: Food safety; Psychrotrophic bacteria; Microbial adhesion; Stagnation zones.

1. INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados são produtos processados largamente consumidos no mundo. De acordo com a Comissão Europeia, de 2017 a 2020, a produção global de leite variou de 610.724 a 643.769 mil toneladas, sendo o Brasil um dos principais produtores (GRANATO et al., 2022). Nesse contexto, a segurança microbiológica e a qualidade nutricional desses produtos são parâmetros chave tanto para a indústria de processamento quanto para os consumidores (MOK et al., 2020). Dessa forma, a indústria de processamento de produtos lácteos tradicionalmente se concentra sobre os desafios relacionados com a garantia da segurança microbiológica dos alimentos (VAN DERLYKE et al., 2022).

O leite é suscetível à contaminação microbiana durante todo seu processo de obtenção, processamento e armazenamento devido aos nutrientes e ao alto teor de umidade (ZHANG et al., 2020). Neste sentido, muitos produtos lácteos são descartados e inutilizados após o fim da vida de prateleira, o que causa prejuízos econômicos e ambientais (NASRALLA et al., 2022). A contaminação no pós-processamento de alimentos é um fator que contribui para surtos de doenças transmitidas por alimentos (MARTIN et al., 2018).

A descontaminação e conservação de produtos alimentícios antes do processo de embalagem é altamente desejável na indústria alimentícia, pois pode reduzir o risco de surtos de origem alimentar para os consumidores (LEIPOLD et al., 2011; YONG et al., 2015). Essa tendência exige o desenvolvimento de alternativas e tecnologias para maximizar a segurança e a qualidade dos alimentos, e assim melhorar a sustentabilidade da cadeia de produção dos alimentos (DE MORAES et al., 2020).

Nesse sentido, a refrigeração é uma estratégia para mitigar a proliferação de microrganismos e deterioração dos produtos acabados. No entanto, os microrganismos psicrotróficos são tolerantes à refrigeração e apresentam capacidade de crescerem sob baixas temperaturas (CRUZ e MOTTA, 2019). Essa combinação levou a condições seletivas para esse grupo de microrganismos (PUGA et al., 2016). Dessa forma, é preocupante para indústria, os microrganismos psicrotróficos que são responsáveis por perdas e contaminação dos produtos processados, em especial, as espécies *Listeria* e *Pseudomonas*.

Augustín e Brugnoli (2018) destacaram que células de *L. innocua* têm sido encontradas nos mesmos ambientes que *L. monocytogenes*, sendo essa patogênica, bem como sendo isolados dos mesmos alimentos. Além disso, estudos mostraram a capacidade de células de *L. innocua* promover alterações nos lipídios da membrana em resposta a certos tipos de estresse, como, estresse ácido, escassez de nutrientes, frio e calor e então produzir mudanças na hidrofobicidade das células e alterar também a sensibilidade das células aos desinfetantes químicos (MOORMAN et al., 2007).

Su et al. (2022) destacaram atenção à *P. fluorescens*, relatando que as condições convencionais de tratamento e higienização podem não ser suficientes para inativar as células de *P. fluorescens* em superfícies de contato com alimentos na indústria, como equipamentos, esteiras de transporte e recipientes para alimentos. Além disso, a protease é um metabólito secretado pela *P. fluorescens* resistente ao calor e responsável pela deterioração e redução da qualidade dos produtos lácteos (WANG et al., 2022).

Em um sistema de processamento com tubulações, a segurança microbiológica dos produtos deve ser assegurada por procedimentos higiênicos eficientes usando método *clean in place* (CIP) (FAILLE et al., 2018). No entanto, diversas condições afetam a eficiência do processo de higienização CIP, tais como, propriedades físicas e químicas da sujidade; propriedades de superfície (hidrofobicidade, rugosidade); perfil de temperatura entre o volume do fluido e a superfície, produtos químicos e concentração empregada e condições hidrodinâmicas, tais como, velocidade de fluxo, tensão de cisalhamento na superfície, geometria do equipamento e a presença de zonas de estagnação de fluidos (SILVA et al., 2020).

Nesse aspecto, as técnicas de fluidodinâmica computacional (CFD) são úteis para conhecer os efeitos da geometria do sistema de tubulações na dinâmica dos fluidos (SHARMA e MACCHIETTO, 2020). Dessa forma, torna-se possível prever o comportamento dos fluidos detergente e sanitizante no interior das tubulações e prever regiões de risco com condições hidrodinâmicas desfavoráveis à higienização, considerando a tensão de cisalhamento e intensidade de flutuação (YANG et al., 2018). Somado a isso, a simulação CFD reduz os custos, consumo de insumos, paradas na produção e geração de efluentes, uma vez que é capaz de substituir inúmeros testes experimentais na planta industrial pela previsão numérica dos modelos de transporte (LI et al., 2019; ASTERIADOU et al., 2007).

As indústrias químicas e alimentícias estão se concentrando na redução do impacto econômico e ambiental das operações de limpeza (AVILA-SIERRA et al., 2021). Nesse sentido, é importante identificar oportunidades de melhoria na higienização CIP, devido ao grande volume de água gasto, produtos químicos, energia consumida e o impacto ambiental gerado. Tem sido relatado que a limpeza é responsável por 30% da energia utilizada no processamento de laticínios. A limpeza também leva uma quantidade significativa de tempo que afeta a produtividade já que o tempo gasto na limpeza não pode ser usado para fabricar produtos (ESCRIG et al., 2020).

Nesta perspectiva, a proposta deste capítulo foi investigar a adesão de *L. innocua* e *P. fluorescens* a diferentes geometrias de um sistema de circulação de aço inoxidável para processamento leite, avaliar o procedimento de higienização CIP considerando cinco diferentes geometrias comumente encontradas em unidades de processamento industrial (seção cilíndrica reta, seção em tê, cotovelo, expansão e redução do diâmetro do tubo). Além disso, analisar o comportamento dos fluidos em cada geometria utilizando a técnica CFD em 3D, avaliando modelos de turbulência e estimando o consumo operacional de insumos para realizar o processo CIP.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

Utilizou-se suspensão bacteriana de *Listeria innocua* (ATCC 33090) e *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) neste trabalho. Essas culturas estavam liofilizadas e a ativação foi realizada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Merck, São Paulo, Brasil), três vezes consecutivas e incubadas por 24 h nas temperaturas de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para *L. innocua* e para *P. fluorescens* respectivamente.

Após três ativações, uma alíquota foi transferida para o leite integral UHT (Bonalat), previamente esterilizado em autoclave, de forma a produzir uma suspensão a 1% de inóculo, a qual era inserida no interior das geometrias. O número de microrganismos foi determinado por contagem total em placas utilizando ágar padrão para contagem (PCA, Kasvi, Itália) e o número de unidade formadoras de colônias por mL foi de aproximadamente 10^8 UFC.mL^{-1} .

2.2 Adesão microbiana

Antes do processo de higienização CIP das superfícies em estudo, todas as geometrias foram previamente limpas com água potável e detergente líquido neutro e esterilizadas a 121°C por 30 min em autoclave (Digitale).

Posteriormente, as geometrias foram preenchidas com leite integral, previamente esterilizado, inoculado com o microrganismo em estudo. Em seguida, *L. innocua* foi incubada durante 12 h a 37°C e as geometrias com *P. fluorescens* foram incubadas a 26°C durante 15 h. O período de incubação foi determinado pela cinética de adesão previamente. A incubação estática foi escolhida para garantir a homogeneidade da adesão na superfície e isolar os efeitos hidrodinâmicos conforme sugerido por Lelièvre et al. (2002) e Silva et al. (2020).

Após o período de incubação, o leite foi drenado e as geometrias foram instaladas na linha de circulação para serem submetidas ao processo CIP. Uma réplica da geometria utilizada na higienização foi selecionada para a contagem inicial de células na superfície. Essa geometria foi preenchida com água peptonada (Acumedia, Lansing, Estados Unidos) 0,1% (m/v), a qual permaneceu no interior da superfície, por 1 min, e em seguida descartada para remoção das células planctônicas.

As células sésseis foram removidas com auxílio de um *swab* e transferidas para uma solução de água peptonada 0,1% (m/v) onde permaneceu por 2 min em agitação em vórtex (Velp, Wizard Advanced IR) para a liberação das células para a solução. Após essa etapa, diluições seriadas foram preparadas e plaqueadas em ágar padrão para contagem (PCA – Kasvi, Itália). As placas foram incubadas por 24 h. O resultado da contagem foi expresso em UFC.cm⁻². Para a expressão dos resultados, aplicou-se a Equação 2.1:

$$Contagem[UFC \cdot cm^{-2}] = \frac{NV_R}{V_D A} \quad (2.1)$$

em que: *C*: contagem média do número de colônias após incubação [UFC]; *V_R*: Volume usado na *rinsagem* [mL]; *V_A*: Volume usado para plaqueamento da amostra [mL]; *A*: área da geometria [cm²].

2.3 Unidade experimental

O sistema utilizado neste estudo foi descrito por Silva et al. (2020). Uma tubulação com estrutura e características similares às usadas em unidades de processamento de produtos lácteos, em aço inoxidável AISI 304, grau de polimento #4. O protótipo da linha de circulação está apresentado na Fig 2.1 A.

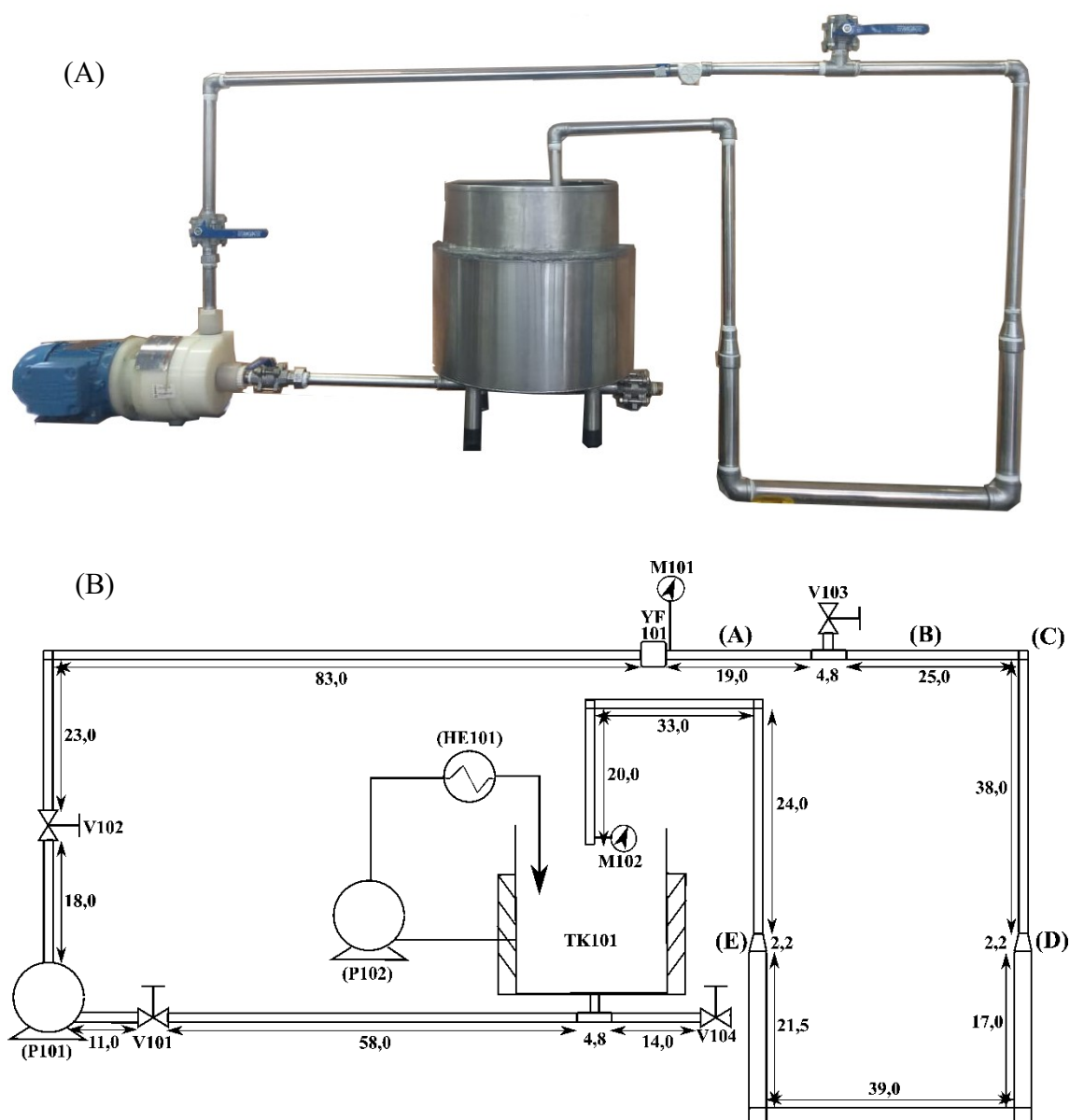


Figura 2.1 –Protótipo (A) e representação esquemática da linha de circulação (B).

Legenda: TK – tanque de armazenamento de leite e soluções de limpeza (capacidade de 25 L); V – válvulas de bloqueio tipo esfera com conexão roscada de ½’’; P – bomba centrífuga para promover a circulação de fluidos e agentes de limpeza no sistema; YF - sensor de vazão da turbina ½'', M - manômetro de tubo em U, HE - trocador de calor, superfícies de diferentes geometrias: seção cilíndrica reta (A), tê (B), cotovelo (C), expansão (D) e redução (E).

A linha era composta por seções com extremidades rosqueáveis, que permitia a desmontagem e amostragem da superfície das geometrias em investigação. As seções de teste estudadas foram: trecho cilíndrico reto (A), tê (B), cotovelo (C), expansão ½” para 1” (D) e redução 1” para ½” (E). Essas geometrias são usualmente encontradas nas linhas de circulação e apresentam diferentes intensidades de cisalhamento. Os instrumentos e o sistema de controle da vazão com controlador PID em Arduino conforme descrito por Silva et al. (2019) são mostrados na Fig. 2.1 B.

2.4 Simulação CFD

2.4.1 Teste de independência de malha computacional

A criação da geometria e a aplicação da malha foram criadas usando o *software Gambit*. O resolvidor numérico foi feito no *ANSYS Student*. A densidade de células na malha foi determinada aumentando a quantidade de células até que a queda de pressão se tornasse constante. Uma representação esquemática do sistema e da malha aplicada são apresentados na Fig. 2.2. As malhas em 3D foram compostas principalmente de células na forma de hexaedros.

Para resolução, a condição de contorno na extremidade lateral esquerda do tubo disposto na posição horizontal foi definida uma entrada do tipo *velocity inlet*. Nessa condição de contorno, foi informado o valor de $1,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ e na saída, ao final do trecho reto vertical, foi especificada a condição de saída *pressure outlet* como pressão atmosférica. Dessa forma, em relação a pressão relativa (*pressure gauge*) foi adotado o valor nulo para as simulações.

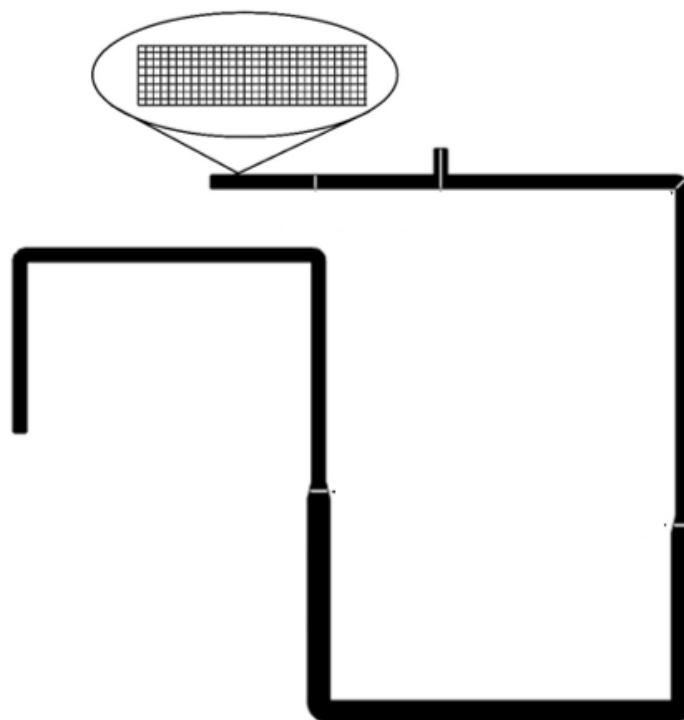


Figura 2.2 - Representação do *layout* da tubulação e aplicação da malha.

Os fluidos utilizados no processo CIP foram água e soluções aquosas de agentes químicos de limpeza como NaOH e sanitização, o ácido peracético. Dessa forma, as propriedades da solução dos agentes de limpeza e sanitização foram assumidas iguais as da água, como sugerido por Yang et al. (2018).

A malha de 19.409 células foi escolhida, pois proporcionou resultados suficientemente precisos. O uso de uma malha mais refinada não afetou significativamente o resultado e apresentou maior tempo de simulação. A influência da discretização da geometria em função da queda de pressão entre os pontos M101 e M102 no sistema é apresentada na Fig. 2.3.

Em relação aos métodos de solução, no acoplamento pressão/velocidade foi empregado a configuração *Coupled*. Na estratégia de interpolação, o método utilizado foi *Second order*. Os fatores de relaxação foram empregados na forma *Default*. Por último, o critério de convergência da solução foi de 10^{-4} .

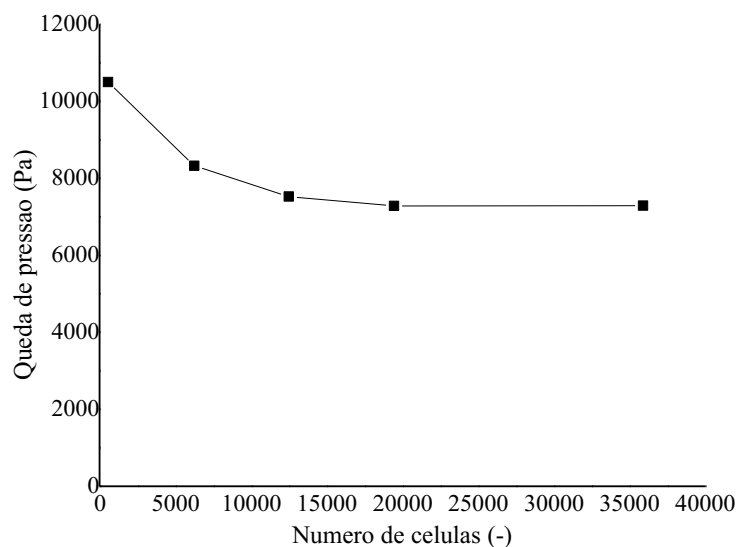


Figura 2.3 - Queda de pressão em função do número de células na discretização da geometria.

2.4.2 Modelo de turbulência

Diversos modelos de turbulência estão disponíveis e foram implementados para representar os escoamentos de fluidos (BOUVIER et al., 2014). O modelo de turbulência $k-\varepsilon$ pode apresentar limitações, mas algumas vantagens, como a operar com limitação de recursos computacionais e a aptidão para alcançar a convergência.

O modelo de turbulência $k-\omega$ de transporte de tensão de cisalhamento tem muitas melhorias em relação ao modelo $k-\varepsilon$. Esses dois modelos foram testados e comparados com os valores experimentais usando a curva de atrito do sistema.

2.4.3 Validação do modelo

A validação do modelo de turbulência foi realizada comparando a curva experimental com resultados obtidos por simulação CFD para curva do fator de atrito ($f/2$) para fluidos newtonianos em função do número de Reynolds (Re), conforme mostrado na Equação 2.2.

$$\frac{f}{2} = \frac{|\Delta P| d}{4L\rho v^2} \quad (2.2)$$

Os experimentos foram realizados utilizando água potável a uma temperatura constante. O número Reynolds foi calculado conforme mostrado na Equação 2.3.

$$Re = \frac{\rho v d}{\mu} \quad (2.3)$$

sendo, L o comprimento da tubulação de aço inoxidável, ΔP a queda de pressão observada entre os manômetros M101 e M102, ρ a densidade da solução sanitizante, v a velocidade média do escoamento, d o diâmetro da tubulação e μ a viscosidade dinâmica da solução sanitizante.

De acordo com comportamento do fator $f/2$ mostrado na Fig. 2.4, observou-se que o modelo $k-\omega$ apresentou melhor ajuste aos dados experimentais. Dessa forma, o modelo SST $k-\omega$ foi selecionado para as simulações fluidodinâmicas deste trabalho.

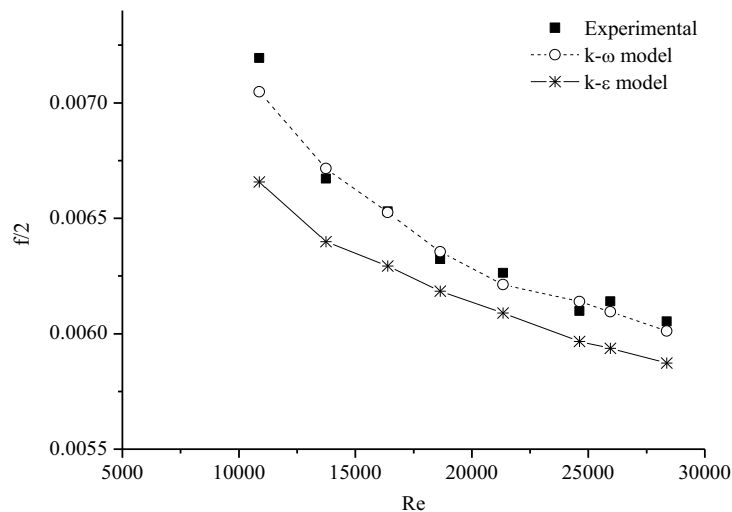


Figura 2.4 - Curvas do fator de atrito experimental e calculado para os modelos de turbulência.

2.5 Higienização

Após as geometrias serem submetidas à contaminação, elas foram instaladas na linha de circulação para a realização da higienização CIP, tradicionalmente executada, diariamente, na indústria de laticínios e que compreende as seguintes etapas: pré-enxágue, detergente alcalino, enxágue, sanitização e enxágue final.

Primeiramente, preencheu-se o tanque de armazenamento (TK 101) com água potável da rede de distribuição a temperatura ambiente para o pré-enxágue. Iniciou-se a circulação da água em circuito aberto por 5 min para remoção de resíduos de leite. Todas as etapas do procedimento foram executadas com velocidade média de $1,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ conforme recomendado pela literatura (TAMINE, 2008; ANDRADE 2008) para higienização de tubulações, produzindo um escoamento turbulento com Reynolds igual a 23700.

Ao final do pré-enxágue, deu-se início à limpeza alcalina com a circulação do detergente NaOH (SOL) a 1% (m/v) em circuito fechado durante 15 min, conforme sugerido por Andrade (2008) e a temperatura de 70°C conforme indicado pela Tetra Park (2015) para procedimento CIP de tubulações. O enxágue do detergente alcalino foi realizado com água potável em circuito aberto para remoção do NaOH residual. O enxágue foi finalizado quando a condutividade do efluente da tubulação era equivalente à condutividade da água de alimentação no valor de $200 \pm 12 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

A sanitização foi realizada com ácido peracético (Start Química) à temperatura ambiente durante 15 min a 100 ppm (ANDRADE, 2008; COSTA et al., 2017) em circuito fechado de circulação do sanitizante. Por fim, realizou o enxágue com água potável em circuito aberto durante 5 min para remoção do sanitizante residual.

A eficácia do processo foi determinada em termos de redução decimal na contagem de células de acordo com proposto por Sharma e Anand (2002) e utilizado por Kumari e Sakar (2014) e Silva et al. (2020). A quantificação de células sobreviventes após o processo CIP foi determinada pela técnica *swab*, com diluições seriadas em água peptonada (Acumedia, Michigan) e plaqueamento em ágar PCA. As placas foram incubadas na temperatura ótima de crescimento por 24 h, e as colônias foram contadas e expressas como $\log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$. A Redução Decimal (RD) de células aderidas nas geometrias foi determinado pela Equação 2.4.

$$RD = \log N - \log n \quad (2.4)$$

em que N representa a contagem inicial de células na superfície ($\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) e n a contagem de ($\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) após o processo CIP.

2.6 Consumo operacional

O consumo operacional do processo CIP foi determinado considerando a energia elétrica ($\delta_{Elétrica}$) consumida pela bomba para circulação dos fluidos, a energia consumida para aquecimento ($\delta_{Aquecimento}$) da solução alcalina e o volume de água gasto ($\delta_{Água}$).

O consumo de água potável para enxágue foi determinado com base na vazão, como apresentado na Equação 2.5 e proposto por Silva e Gedraite (2018). O consumo energético para bombeamento foi determinado com base na Equação 2.6, monitorando a corrente da linha através de um alicate amperimétrico modelo ET-3200 Minipa. A energia gasta no aquecimento foi calculada pela Equação 2.7 conforme sugerido por Yang et al. (2019).

$$\delta_{Água} = \int_{t=0}^t \dot{V} dt \quad (2.5)$$

$$\delta_{eletricidade} = \sqrt{3} V_L \cos \theta \int_0^t I_L(t) dt \quad (2.6)$$

$$\delta_{aquecimento} = V \rho c_p (T - T_0) \quad (2.7)$$

em que, V_L : tensão de linha [V]; I_L : corrente de linha [A]; θ : ângulo de fase; V : volume de solução [m³]; ρ : massa específica da água [kg·m⁻³]; c_p : calor específico da água [J/kg°C] T : temperatura [°C]; T_0 : temperatura ambiente [°C] , Q vazão volumétrica [L·s⁻¹]

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com intervalos de confiança de 95% para determinar a significância dos efeitos. A média de adesão na contaminação das geometrias e redução decimal de células na higienização em log UFC.cm⁻² foram comparadas pelo teste de Duncan. Os fatores relacionados aos experimentos de adesão e higienização foram cinco superfícies e dois microrganismos em cultura pura. Os resultados foram tratados utilizando o *software* estatístico STATISTICA (versão 7.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Contaminação da superfície

Após o período de incubação das geometrias, com respectivo binômio tempo e temperatura ótimo para cada microrganismo, a contaminação observada na superfície de cada geometria é apresentada na Tabela 2.1. A adesão de *L. innocua* apresentou valor médio de $5,86 \pm 0,18 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ e $4,28 \pm 0,24 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ para *Pseudomonas fluorescens*. Constatou-se que o quantitativo de células de *L. innocua* aderidas na superfície foi significativamente superior às células de *P. fluorescens* ($p < 0,05$).

Essa diferença na adesão pode estar relacionada à termodinâmica de adesão destes microrganismos. Autores mostraram que *L. innocua* é mais hidrofóbica (HUANG e NITIN, 2017) que *P. fluorescens* (YEO e CHUA, 2004; ABBASNEZHAD et al., 2008), o que pode ter contribuído para maior adesão daquelas células à superfície de aço inoxidável.

Além disso, Chavant et al. (2002) propuseram que a rápida colonização das superfícies resulta na formação de agregados celulares com número relativamente baixo de células aderidas, consequentemente, esses agregados são volumosos e se desprendem devido às fracas interações das poucas células aderidas à superfície. Essa menor adesão observada para *P. fluorescens* é justificada pelos fatores cinéticos, como menor velocidade de crescimento e termodinâmicos como maior energia livre de Gibbs, conforme discutidos no Capítulo 1.

Tabela 2.1 – Adesão inicial das células de *L. innocua* e *P. fluorescens* nas diferentes geometrias após incubação estática.

Geometria	Adesão [$\log \text{ UFC.cm}^{-2}$]	
	<i>L. innocua</i>	<i>P. fluorescens</i>
Trecho Reto (A)	$5,84 \pm 0,21^{\text{Aa}}$	$4,17 \pm 0,10^{\text{Ab}}$
Tê (B)	$5,98 \pm 0,06^{\text{Aa}}$	$4,20 \pm 0,07^{\text{Ab}}$
Cotovelo 90° (C)	$5,97 \pm 0,11^{\text{Aa}}$	$4,49 \pm 0,38^{\text{Ab}}$
Expansão (D)	$5,81 \pm 0,20^{\text{Aa}}$	$4,23 \pm 0,05^{\text{Ab}}$
Redução (E)	$5,70 \pm 0,18^{\text{Aa}}$	$4,30 \pm 0,25^{\text{Ab}}$

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna ou por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferiram pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os valores representam a média de três repetições.

Dessa forma, observou-se que não houve diferença significativa na adesão de um mesmo microrganismo em função da geometria. Essa observação está alinhada aos resultados obtidos em estudos de adesão de bactérias ao aço inoxidável, visto que ambas as geometrias são construídas com o mesmo material e especificação (RODRIGUEZ et al., 2008; CHIA et al., 2009; CASARIN et al., 2016). Schlisselberg e Yaron (2013) explicaram que a adesão é favorecida quando a rugosidade tem valores semelhante ao tamanho da célula (aprox. 1,0 μm), o que pode causar o aprisionamento das células dentro dos sulcos das superfícies.

O aço inoxidável com polimento #4 apresenta rugosidade média de 0,6 μm (CASARIN et al., 2016). Nesse contexto, preconiza-se que a rugosidade seja inferior a 1,0 μm nas superfícies de processamento da indústria láctea. Já a EHEDG (European Hygienic Engineering and Design Group) recomenda um acabamento com rugosidade de 0,8 μm , ou inferior, para as superfícies de processamento (EHEDG, 2004).

Além disso, as geometrias expansão e redução, que apresentavam uma linha de solda, não apresentam diferença significativa de adesão das células de *L. innocua* ou *P. fluorescens*. Estudos demonstraram que não houve diferenças significativas nos níveis de adesão entre as superfícies soldadas (MIG e TIG) e as superfícies não soldadas (aço inoxidável sem soldas) para *L. monocytogenes* (CASARIN et al., 2014). As investigações de Casarin et al. (2014) sobre hidrofobicidades da superfície com e sem solda mostraram que ambas as superfícies foram classificadas como hidrofóbicas. Apesar dos diferentes níveis de hidrofobicidade não houve relação entre adesão e hidrofobicidade superficial. Isso está de acordo com os resultados de Silva et al. (2008), realizado em condições estáticas, e com os trabalhos de Szlavik et al. (2012), que foram realizados sob condições de fluxo de líquido.

De modo geral, é preocupante e desafiador o alto nível de contaminação observado nas superfícies, visto que diversos autores têm sugerido o uso de *Listeria* spp. como um indicador de uma possível contaminação por *L. monocytogenes*. Costa et al. (2018) não observaram nenhuma diferença significativa na capacidade de adesão de ambas as espécies de *Listeria*. Costa et al. (2016) mostraram resultados de adesão de *L. innocua* em cupons de aço inoxidável na faixa de 5,65 a 6,74 log UFC·cm⁻² similares aos resultados deste trabalho.

Da mesma forma, ao longo de 24 h de operação, tempo usualmente empregado nas indústrias de processamento de leite (WANG et al., 2018), *P. fluorescens* foi capaz de se

multiplicar em temperatura ambiente e causar contaminação no tubos e acessórios. Além disso, a contagem de células na superfície mostrou que processo CIP inadequado, pode ocasionar células residuais e desenvolver a contaminação neste ambiente. Careli et al. (2009) mostraram valores próximos no estudo da adesão de *P. fluorescens* em aço inoxidável, no qual se alcançou 5 log UFC.cm⁻² após 10 h de contato com a superfície.

3.2 Processo CIP

Na Tabela 2.2 é apresentado os valores da redução decimal média observada em cada geometria da tubulação e a contagem final de células restantes de *L. innocua* e *P. fluorescens* em cada geometria de aço inoxidável presente no sistema de tubulação. A análise da variância (ANOVA) mostrou que a geometria e o microrganismo envolvido na contaminação foram significativos no processo de higienização CIP das superfícies.

Tabela 2.2 - Redução decimal para as bactérias e contagem final de células na superfície de cada geometria.

Geometria	<i>L. innocua</i>		<i>P. fluorescens</i>	
	Redução	Contagem final (UFC.cm ⁻²)	Redução	Contagem final (UFC.cm ⁻²)
Trecho Reto (A)	5,62 ± 0,25 ^{Aa}	< 1	4,40 ± 0,29 ^{Ab}	< 1
Tê (B)	2,91 ± 0,18 ^{Da}	758,57 ± 68	2,02 ± 0,23 ^{Bb}	163 ± 16
Cotovelo 90° (C)	4,51 ± 0,08 ^{Ca}	18,23 ± 4,79	4,25 ± 0,36 ^{Aa}	< 1
Expansão (D)	4,80 ± 0,34 ^{Ca}	5,72 ± 0,33	4,31 ± 0,26 ^{Ab}	< 1
Redução (E)	5,27 ± 0,21 ^{Ba}	< 1	4,34 ± 0,24 ^{Ab}	< 1

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna ou por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferiram pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os valores representam a média de três repetições.

A destruição e remoção das células bacterianas de *Listeria* foi superior à observada em relação à de *Pseudomonas* em todas as geometrias, exceto no cotovelo, em que a redução foi estatisticamente igual. As reduções decimais superiores observadas com a higienização CIP para a maioria das geometrias está associado ao fato de que a contaminação inicial de *Listeria* era superior, ou seja, apresentava mais células aderidas

às superfícies. Além disso, não houve produção de EPS pela *L. innocua* o que torna o processo de destruição e remoção das células mais fácil quando comparado a sanitização da superfície contaminada com *P. fluorescens* já que essa produziu EPS.

Na higienização das superfícies contaminadas com *P. fluorescens* não houve diferenças significativas nas reduções decimais entre geometrias de tubos na forma de seção cilíndrica reta, cotovelo, expansão e redução. Por outro lado, a seção em tê apresentou menor redução decimal de células quando comparada às demais geometrias ($p < 0,05$), devido à fluidodinâmica da solução sanitizante dentro do tê.

No processo CIP das superfícies contaminadas com *L. innocua*, o trecho reto cilíndrico foi a geometria que apresentou a maior redução decimal na contagem de células. Seguido do trecho reto, a redução de diâmetro foi a geometria que apresentou a segunda maior redução decimal na contagem de células de *L. innocua*. A curva de 90° e a expansão não apresentaram diferença estatística na remoção e destruição das células e foram a terceira maior redução decimal. Por último, a parte da tubulação na forma de tê apresentou a menor redução decimal de células quando comparada as demais geometrias – Tabela 2.2.

Observou-se na Fig. 2.5A que o escoamento no interior do tubo cilíndrico ocorreu de forma uniforme por toda a superfície interna da geometria e consequentemente a mesma velocidade de aproximadamente $1,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ no processo de higienização CIP. Nessa configuração o escoamento do fluido produziu uma tensão de cisalhamento na superfície de aproximadamente 6,5 Pa (Fig. 2.5B) a qual associada a ação do sanitizante promoveu a remoção e destruição das células que estavam fixadas na superfície do aço inoxidável. Lelièvre et al. (2002) mostraram que a tensão cisalhante média tem efeito significativo na remoção de *B. cereus* aderidas à superfície de aço inoxidável e que de modo geral, o trecho reto apresentou melhores níveis de remoção.

Na ramificação em tê notou-se a existência de uma zona de estagnação com recirculação de fluido a baixas velocidades, na ordem de $0,3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, conforme mostrado na Fig. 2.5C. Em consequência disso, sobre essa superfície foi aplicado tensão de cisalhamento menor que 0,5 Pa, mostrado na Fig. 2.5D, menor do que aquela observada no trecho reto. Jensen et al. (2007) explicaram que o escoamento gera uma força tangencial local agindo sobre a interface líquido-superfície e atua como um transportador de produtos químicos. Fernandes et al. (2021) e Paz et al. (2013) indicaram a tensão de cisalhamento como um parâmetro mais expressivo na remoção local do que a velocidade.

As baixas velocidades e lenta troca de fluido torna essas regiões mais difíceis de higienizar (LI et al., 2019). Jensen e Friis (2005) também relataram que as regiões mais difíceis de limpar são trechos sem saída e fendas na geometria que produzem zonas de recirculação e estagnação, conforme a região observada na ramificação da geometria tê. Associado a isso, a baixa tensão de cisalhamento e menor transferência de massa dos agentes químicos acarreta na redução da eficiência.

No entanto, vale destacar que a ramificação em tê nem sempre produz zonas de recirculação e estagnação de fluido. Figueredo et al. (2009) mostraram em higienizações em uso simulado que a remoção de células de *P. aeruginosa* foi superior no trecho tê em comparação ao trecho reto da tubulação. Essa diferença está relacionada ao *layout* da tubulação, ao posicionamento das geometrias na linha de processamento e ao fluxo que foram submetidos.

Na região do cotovelo, notou-se a formação de um caminho preferencial próximo à concavidade interna menor da geometria. Nessa parte da geometria, o escoamento ocorreu com maiores velocidades de aproximadamente $2,3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ levando ao cisalhamento de aproximadamente de 13,0 Pa. Em detrimento a essa dinâmica, o lado oposto, próximo à concavidade maior, a região foi submetida a menores velocidades de $0,6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ que produziu um cisalhamento de aproximadamente 4,0 Pa, conforme mostrado na Fig. 2.5E e Fig. 2.5F. Pelo fato de a interface de maior área ter experimentado de menores velocidades e menor cisalhamento, ocorreu menor destruição e remoção das células, o que justifica a menor sanitização em comparação ao trecho cilíndrico reto.

Por outro lado, esse efeito não é extensível a todos os cotovelos de um sistema de tubulação. Dev et al. (2014) trabalharam na higienização CIP de uma tubulação de ordenhas de leite cru e relataram que o cotovelo foi uma geometria mais difícil de higienizar em comparação ao trecho reto. Figueiredo et al. (2009) também mostraram diferença significativa na remoção de *P. aeruginosa* entre as geometrias cilíndrica reta e o cotovelo de 90°. Dessa forma, a eficiência da higienização é um processo complexo e depende de inúmeros fatores tais como *layout* da tubulação, características dos microrganismos, variabilidade e estrutura do biofilme e propriedades físico-químicas como a carga e a hidrofobicidade (WU et al., 2012).

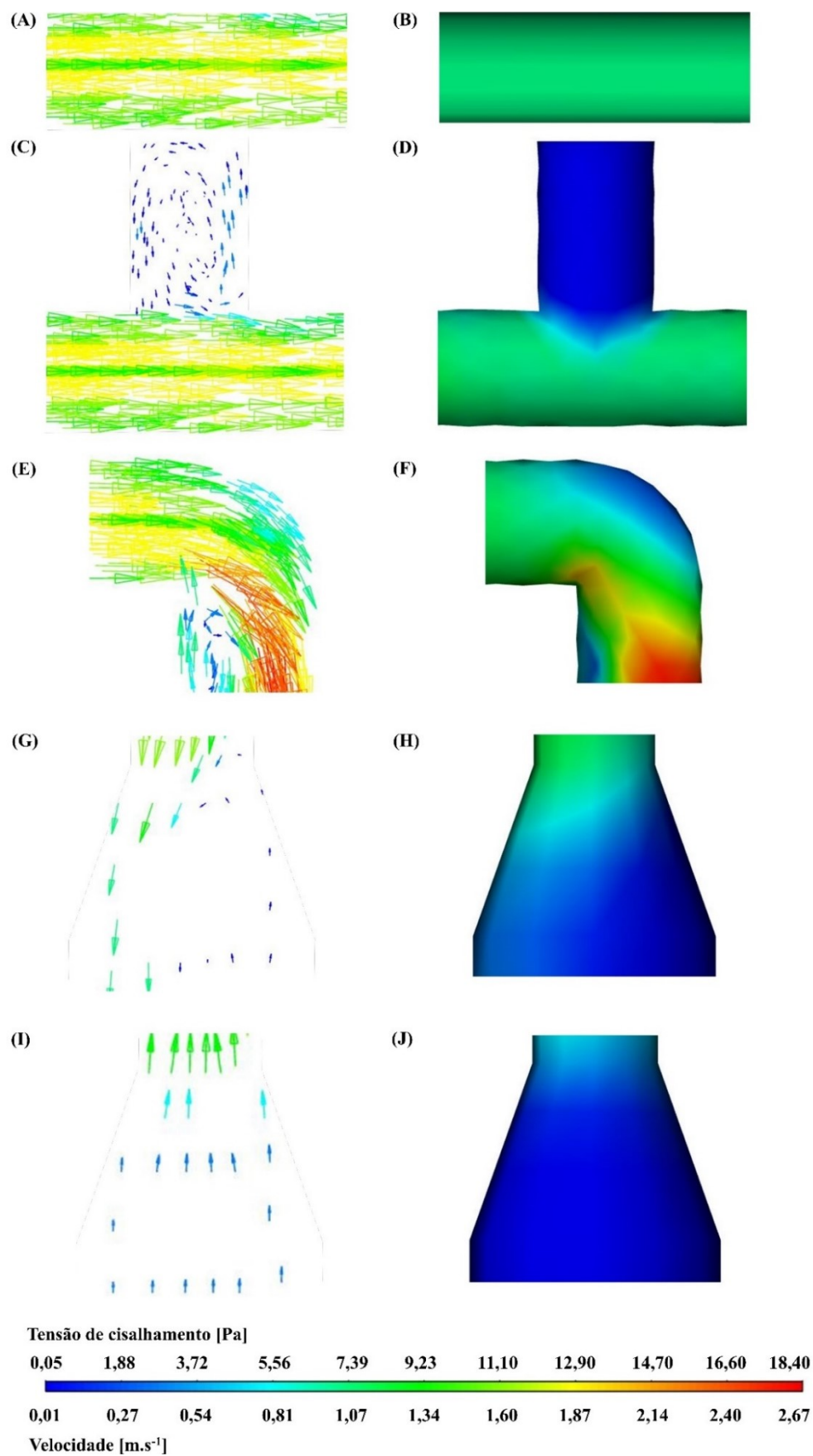


Figura 2.5- Vetores de velocidade e tensão de cisalhamento (A, B) trecho reto, (C, D) tê, (E, F) cotovelo, (G, H) expansão e (I, J) redução.

Os acessórios de tubulação na forma de expansão e redução são usualmente empregados nas indústrias de alimentos (BLEL et al., 2007) para adaptação do diâmetro da tubulação. Neste estudo a expansão de diâmetro apresentou uma zona de recirculação com baixas velocidades ($< 0,2 \text{ m.s}^{-1}$), em uma região da geometria, como mostrado na Fig. 2.5G. Em consequência disso, a tensão cisalhante nesta região foi inferior a $2,0 \text{ Pa}$ – Fig. 2.5H. Toda essa combinação culminou em menor destruição e remoção de células de *L. innocua* nessa geometria, quando comparado à redução.

Na redução de diâmetro houve redução de velocidade do fluido de sanitização, no entanto, não ocorreu a formação de zonas de recirculação. Dessa forma, nessa geometria apresentaram velocidade média de aproximadamente $0,5 \text{ m.s}^{-1}$, Fig. 2.5I, distribuída de forma mais uniforme por toda a geometria. A tensão cisalhante aplicada nessa região foi de aproximadamente $2,0 \text{ Pa}$. Esse comportamento mais uniforme do fluido permitiu maiores reduções decimais de *Listeria innocua* na redução de diâmetro em comparação à expansão. Lelièvre et al. (2002) destacaram a ocorrência de baixas velocidades onde ocorre o turbilhão do fluido na seção cônica e classificaram essas formas como regiões de difícil higienização, visto que a tensão de cisalhamento nestes pontos localizados é baixa e não uniforme ao longo da geometria.

A contagem final de unidades formadoras de colônias por área em centímetros quadrados ($\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) é um importante parâmetro para avaliação microbiológica das superfícies de processamento de alimentos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) recomendam contagens de até $50 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ de mesófilos aeróbios para superfície ser considerada higienizada. Por outro lado, a *American Public Health Association* (APHA) preconiza uma recomendação mais rigorosa com contagens de até $2 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ para superfícies serem ditas higienizadas.

Nessa perspectiva, a superfície do trecho cilíndrico reto e da redução de diâmetro, contaminadas com *L. innocua*, apresentaram contagens menores que $1 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ e foram consideradas satisfatoriamente higienizadas com base na recomendação da OMS, OPAS e APHA. Por outro lado, o cotovelo e a expansão, estão aptos com base apenas na preconização da OMS por apresentarem contagens inferiores a $50 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$. Por último, a ramificação da tubulação em tê, não está dentro das recomendações dos órgãos citados, visto que a contagem supera o valor recomendado.

Por outro lado, todas as superfícies contaminadas com *P. fluorescens* são consideradas higienizadas sob a perspectiva das recomendações da OMS, OPAS e APHA, já que apresentaram contagens finais menores que 1 UFC·cm⁻², exceto a ramificação em tê.

3.3 Consumo do processo

Os três enxágues do CIP, a etapa de limpeza alcalina e a sanitização demandaram tempos equivalentes no processo de higienização como mostrado na Fig. 2.6A. O consumo de água potável foi consideravelmente maior nas etapas de enxágues. Já as etapas de limpeza alcalina e sanitização consomem as mesmas quantidades de água, Fig. 2.6B, já que o processo opera com a mesma quantidade de produto e a circulação desses agentes químicos é feita em circuito fechado. Yang et al. (2018) relataram que os processos de higienização CIP, em geral, consomem quantidades significativas de água, especialmente as etapas de enxágue das linhas de processamento.

Do ponto de vista energético, Fig.2.6C, a aplicação do detergente alcalino consumiu maior quantidade energia, visto que o produto é aplicado a quente e boa parte da energia é empregada para o aquecimento do fluido juntamente com a energia para circulação do detergente. As etapas de enxágue e sanitização demandam quantidades equivalentes de energia uma vez que operam em tempos equivalentes, por aproximadamente 15 min.

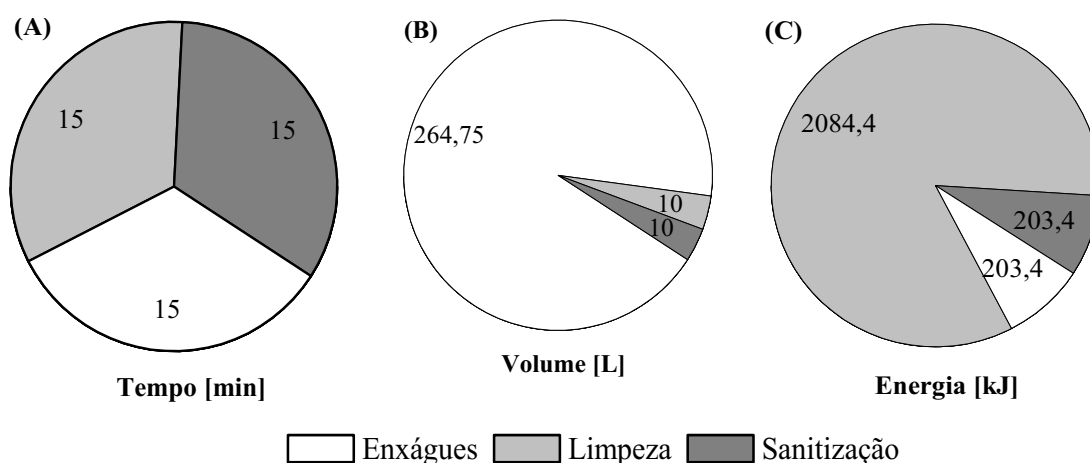


Figura 2.6 - Consumo de insumos (A) tempo, (B) volume de água e (C) energia em cada etapa no processo de higienização CIP.

Fonte: Autores

4. CONCLUSÃO

Esta pesquisa investigou a contaminação de superfícies de aço inoxidável com *P. fluorescens* e *L. innocua*, a higienização CIP da tubulação e respectivos acessórios, a fluidodinâmica do sanitizante e o consumo do processo. Considerando o período de tempo usual de operação da indústria é possível atingir altas contagens de células na superfície, fato que sinaliza maior atenção das indústrias. A fluidodinâmica computacional apresentou-se útil na determinação de regiões de difícil higienização e apontou os pontos mais problemáticos do *design* higiênico. Todas as geometrias mostraram segurança microbiológica ao final do processo de higienização, exceto a ramificação em T que apresentou uma zona de estagnação e recirculação do fluido, o que prejudicou a qualidade da higienização naquela região, segundo recomendações de órgãos como OMS, OPHAS e APHA. Além disso, ficou evidente que o CIP demanda significativa quantidade de água para as etapas de enxágue, assim como a etapa de limpeza alcalina consumiu considerável energia para aquecimento do detergente.

5. REFERÊNCIAS

Abbasnezhad, H., Gray, M. R., e Foght, J. M. (2008). Two different mechanisms for adhesion of Gram-negative bacterium, *Pseudomonas fluorescens* LP6a, to an oil–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(1), 36–41. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.09.023

Agustín, M. del R., e Brugnoli, L. (2018). Multispecies biofilms between *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* with resident microbiota isolated from apple juice processing equipment. *Journal of Food Safety*, 38(5), e12499. Portico. <https://doi.org/10.1111/jfs.12499>

Asteriadou, K., Hasting, T., Bird, M., e Melrose, J. (2007). Predicting cleaning of equipment using computational fluid dynamics. *Journal of Food Process Engineering*, 30(1), 88–105. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00103.x>

Avila-Sierra, A., Vicaria, J. M., Lechuga, M., Martínez-Gallegos, J. F., Olivares-Arias, V., Medina-Rodríguez, A. C., Jiménez-Robles, R., e Jurado-Alameda, E. (2021). Insights into the optimisation of the Clean-In-Place technique: Cleaning, disinfection, and reduced environmental impact using ozone-based formulations. *Food and Bioprocess Technology*, 129, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.08.003>

Careli, R. T., Andrade, N. J., Soares, N. F., Ribeiro Júnior, J. I., Rosado, M. S., e Bernardes, P. C. (2009). The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(1), 171–176. doi:10.1590/s0101-20612009000100026

Casarin, L. S., Brandelli, A., de Oliveira Casarin, F., Soave, P. A., Wanke, C. H., e Tondo, E. C. (2014). Adhesion of Salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes on stainless steel welds. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 103–108. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.003

Casarin, L. S., Casarin, F. de O., Brandelli, A., Novello, J., Ferreira, S. O., e Tondo, E. C. (2016). Influence of free energy on the attachment of Salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes on stainless steels AISI 304 and AISI 316. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 131–138. doi:10.1016/j.lwt.2016.01.035

Chia, T. W. R., Goulter, R. M., McMeekin, T., Dykes, G. A., e Fegan, N. (2009). Attachment of different Salmonella serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26(8), 853–859. doi:10.1016/j.fm.2009.05.012

Costa, A., Bertolotti, L., Brito, L., e Civera, T. (2016). Biofilm Formation and Disinfectant Susceptibility of Persistent and Nonpersistent Listeria monocytogenes Isolates from Gorgonzola Cheese Processing Plants. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(11), 602–609. doi:10.1089/fpd.2016.2154

Costa, A., Lourenco, A., Civera, T., e Brito, L. (2018). Listeria innocua and Listeria monocytogenes strains from dairy plants behave similarly in biofilm sanitizer testing. *LWT*, 92, 477–483. doi:10.1016/j.lwt.2018.02.073

Cruz, K. L., e Motta, A. S (2019). Characterization of biofilm production by Pseudomonas fluorescens isolated from refrigerated raw buffalo milk. *Journal of Food Science and Technology*, 56(10), 4595–4604. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03924-1>

De Moraes, J. O., Hilton, S. T., e Moraru, C. I. (2020). The effect of Pulsed Light and starch films with antimicrobials on Listeria innocua and the quality of sliced cheddar cheese during refrigerated storage. *Food Control*, 112, 107134. doi:10.1016/j.foodcont.2020.107134

EHEDG Doc. 8 Hygienic equipment design criteria. Second edition, April 2004 - European Hygienic Engineering & Design Group.

Escrig, J., Woolley, E., Simeone, A., e Watson, N. J. (2020). Monitoring the cleaning of food fouling in pipes using ultrasonic measurements and machine learning. *Food Control*, 116, 107309. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107309>

Fernandes, S., Gomes, I. B., Simões, L. C., e Simões, M. (2021). Overview on the hydrodynamic conditions found in industrial systems and its impact in (bio)fouling formation. *Chemical Engineering Journal*, 418, 129348. doi:10.1016/j.cej.2021.129348

Granato, D., Carrocho, M., Barros, L., Zabetakis, I., Mocan, A., Tsoupras, A., Cruz, A. G., e Pimentel, T. C. (2022). Implementation of Sustainable Development Goals in the dairy sector: Perspectives on the use of agro-industrial side-streams to design functional foods. *Trends in Food Science e Technology*, 124, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.009>

Huang, K., e Nitin, N. (2017). Enhanced removal of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua* from fresh lettuce leaves using surfactants during simulated washing. *Food Control*, 79, 207–217. doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.032

Li, G., Tang, L., Zhang, X., e Dong, J. (2019). A review of factors affecting the efficiency of clean-in-place procedures in closed processing systems. *Energy*, 178, 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.04.123>

Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2018). Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 861–870. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13339>

Mok, J. H., Pyatkovskyy, T., Yousef, A., e Sastry, S. K. (2021). Effects of combination shear stress, moderate electric field (MEF), and nisin on kinetics and mechanisms of inactivation of *Escherichia coli* K12 and *Listeria innocua* in fresh apple-kale blend juice. *Journal of Food Engineering*, 292, 110262. doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110262

Moorman, M. A., Thelemann, C. A., Zhou, S., Pestka, J. J., Linz, J. E., e Ryser, E. T. (2008). Altered Hydrophobicity and Membrane Composition in Stress-Adapted *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 71(1), 182–185. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.1.182>

Nasralla, N. N., Gomah, N. H., Aly, M. M., Abdel-Aleem, J. A., Hammam, A. R., Osman, D. M., e El-Derwy, Y. M. (2022). Compositional characteristics of dairy products and their potential nondairy applications after shelf-life. *Current Research in Food Science*, 5, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.12.017>

Puga, C. H., Orgaz, B., e SanJose, C. (2016). *Listeria monocytogenes* Impact on Mature or Old *Pseudomonas fluorescens* Biofilms During Growth at 4 and 20°C. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00134>

Rodriguez, A., Autio, W. R., e Mclandsborough, L. A. (2008). Effect of Surface Roughness and Stainless Steel Finish on *Listeria monocytogenes* Attachment and Biofilm Formation. *Journal of Food Protection*, 71(1), 170–175. doi:10.4315/0362-028x-71.1.170

Schlisselberg, D. B., e Yaron, S. (2013). The effects of stainless steel finish on *Salmonella Typhimurium* attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiology*, 35(1), 65–72. doi:10.1016/j.fm.2013.02.005

Sharma, A. Macchietto, S. (2021). Fouling and cleaning of plate heat exchangers: Dairy application. *Food and Bioproducts Processing* volume 126 (1), 32-41. doi.org/10.1016/j.fbp.2020.12.005

Silva, L. D., Filho, U. C., Naves, E. A. A., e Gedraite, R. (2020). Pulsed flow inclean-in-place sanitization to improve hygiene and energy savings in dairy industry. *Journal of Food Process Engineering*. <http://doi:10.1111/jfpe.13590>

Silva, L.D. et al., 2020. Clean in place (CIP) of different stainless steel geometries contaminated with *Pseudomonas fluorescens*. *Research, Society and Development*, 9(12), p.e23491210866. Available at: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i12.10866>.

SILVA, S., TEIXEIRA, P., OLIVEIRA, R., e AZEREDO, J. (2008). Adhesion to and Viability of *Listeria monocytogenes* on Food Contact Surfaces. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1379–1385. doi:10.4315/0362-028x-71.7.1379

Su, Y., Jiang, L., Chen, D., Yu, H., Yang, F., Guo, Y., Xie, Y., e Yao, W. (2022). In vitro and in silico approaches to investigate antimicrobial and biofilm removal efficacies of combined ultrasonic and mild thermal treatment against *Pseudomonas fluorescens*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 83, 105930. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105930>

Szlavik, J., Paiva, D. S., Mørk, N., van den Berg, F., Verran, J., Whitehead, K., ... Nielsen, D. S. (2012). Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to solid surfaces under liquid flow. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 181–188. <http://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.006>

van Derlyke, P., Marín, L. S., e Zreiqat, M. (2022). Discrepancies Between Implementation and Perceived Effectiveness of Leading Safety Indicators in the US Dairy Product Manufacturing Industry. *Safety and Health at Work*. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2022.04.004>

Wang, Y., Sun, J., Deng, Y., Tu, Y., Niu, H., Cai, W., e Han, X. (2022). Whey protein influences the production and activity of extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* W3. *LWT*, 154, 112865. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112865>

Yeo, S.-H., e Chua, L.-Y. (2004). Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* on magnetic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 36(2), 75–80. <http://doi:10.1016/j.colsurfb.2004.05.008>

Zhang, D., Li, S., Palmer, J., Teh, K. H., Leow, S., e Flint, S. (2020). The relationship between numbers of *Pseudomonas* bacteria in milk used to manufacture UHT milk and the effect on product quality. *International Dairy Journal*, 105, 104687. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104687>

CAPÍTULO III - FLUXO PULSADO NA SANITIZAÇÃO CLEAN IN PLACE (CIP) EM TUBULAÇÕES LÁCTEAS CONTAMINADAS COM *LISTERIA* *INNOCUA*

Resumo: A higienização de superfícies de equipamentos e tubulações é um fator determinante na qualidade do produto processado e para segurança microbiológica dos consumidores. Nesse sentido, as superfícies de equipamento e tubulações podem causar contaminação dos alimentos quando mal higienizadas. Este capítulo avaliou a higienização de cinco geometrias: trecho cilíndrico reto, ramificação em tê, curva 90°, expansão e redução de diâmetro, contaminadas com *Listeria innocua* utilizando fluxo pulsado. A sanitização com fluxo constante foi usada como referência e comparativamente estudou-se a etapa de sanitização com fluxo pulsado, avaliando o efeito de quatro variáveis: tempo de circulação do sanitizante, ondulação, período do pulso e concentração do agente químico. Além disso, investigou-se o comportamento fluidodinâmico do escoamento pulsado no interior dessas geometrias. Para isso, foi empregado uma linha de circulação com as mesmas características daquelas encontradas nas indústrias de laticínios, sendo de aço inoxidável 304, polimento #4, com instrumentos de medida e controle do processo. As geometrias foram contaminadas com leite integral UHT, inoculado com *L. innocua* para possibilitar a adesão microbiana. Em seguida, as geometrias foram higienizadas e a amostragem realizada pela técnica de *swab* e o desempenho da higienização foi avaliado com base no número de reduções decimais no quantitativo de células. O delineamento experimental foi projetado por meio de um planejamento composto central que avaliou o efeito das quatro variáveis: tempo, ondulação, período de pulso e concentração do sanitizante no processo com fluxo pulsado. O efeito das variáveis foi avaliado pela metodologia de Superfície Resposta e a otimização executada por meio da técnica da desejabilidade. O estudo fluidodinâmico foi realizado com *software* FLUENT versão *Student* e o consumo energético foi determinado por meio de sensor de corrente elétrica. Os resultados mostraram que a *L. innocua* alcançou níveis altos de adesão durante o tempo usual de operação da indústria. A redução decimal na sanitização tradicional, com fluxo constante, mostrou que o trecho cilíndrico reto e o de redução foram as geometrias que tiveram melhores níveis de higienização quando comparados com a ramificação em tê, que apresentou a menor redução decimal de células em função da formação de zonas de estagnação e recirculação de fluido, observadas na simulação fluidodinâmica. Todas as variáveis do fluxo pulsado foram significativas na sanitização. A condição ótima para sanitização da linha foi determinada em aproximadamente 9 min de circulação do sanitizante a 61ppm, com ondulações de 1,11 e período de duração dos pulsos de 66s e promoveu melhores níveis de higiene, com menor tempo de operação, economia de energia e de agente sanitizante.

Palavras-chave: Higienização; Fluidodinâmica, Pulsos; Otimização, Bactérias Psicrotróficas.

ABSTRACT: The hygienization of equipment and piping surfaces is a determining factor in the quality of the processed product and for the microbiological safety of consumers. In this sense, equipment and piping surfaces can cause food contamination when poorly sanitized. This work evaluated the hygiene of five geometries: straight cylindrical section, tee branching, 90° curve, expansion and diameter reduction, contaminated with *Listeria innocua* using pulsed flow. Sanitization with constant flow was performed as a reference and the sanitization step with pulsed flow was comparatively studied, evaluating the effect of four variables: sanitizing circulation time, undulation, pulse period and chemical agent concentration. Furthermore, the fluid dynamic behavior of the pulsed flow within these geometries was investigated. For this, a circulation line was used with the same characteristics as those found in the dairy industries, being made of stainless steel 304, polishing #4, with instruments for measuring and controlling the process. The geometries were contaminated with UHT whole milk, inoculated with *L. innocua* to allow microbial adhesion. Then, the geometries were cleaned and the sampling performed using the swab technique, and the cleaning performance was evaluated based on the number of decimal reductions in the number of cells. The experimental design was designed using a central composite design that evaluated the effect of four variables: time, undulation, pulse period and sanitizer concentration in the process with pulsed flow. The effect of the variables was evaluated using the Response Surface methodology and the optimization performed using the desirability technique. The fluid dynamic study was carried out using FLUENT software, Student version, and energy consumption was determined using an electric current sensor. The results showed that *L. innocua* achieved high levels of adhesion during the industry's usual operating time. The decimal reduction in traditional sanitization, with constant flow, showed that the straight cylindrical section and the reduction section were the geometries that had better levels of sanitization when compared to the tee branching, which presented the lowest decimal reduction of cells due to the formation of zones of stagnation and fluid recirculation, observed in the fluid dynamic simulation. All pulsed flow variables were significant in sanitization. The optimal condition for sanitizing the line was determined in approximately 9 min of sanitizer circulation at 61ppm, with undulations of 1.11 and pulse duration of 66 s, and promoted better levels of hygiene, with less operating time, energy savings and sanitizing agent.

Keywords: Hygienization; CFD, Pulses; Optimization, Psychrotrophic Bacteria..

1. INTRODUÇÃO

Novos produtos industrializados, como sucos de frutas, purês e produtos lácteos são frequentemente lançados no mercado devido ao valor nutricional, capacidade antioxidante, a presença de compostos bioativos e praticidade no consumo (KABIR et al., 2021). Dessa forma, a indústria de alimentos constantemente preocupa-se com a qualidade e segurança dos produtos acabado. As condições de processamento dos alimentos são fatores decisivos no controle de doenças de origem alimentar, da contaminação cruzada e da adesão e formação de biofilme, além de minimizar as perdas de equipamentos e tubulações e da redução da eficiência em processos de troca térmica (TORQUETI et al., 2019).

As doenças transmitidas por alimentos são desencadeadas por contaminantes biológicos, tais como, bactéria, fungos, vírus e as toxinas produzidas por microrganismos e são consideradas um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (SREY et al., 2013). Além disso, globalmente, estimam-se que mais de 2 bilhões de pessoas estão expostas a alimentos contaminados e que 1 em cada 10 pessoas sofre de pelo menos uma doença transmitida por alimentos por ano (KATSIGIANNIS et al., 2021).

Nessa perspectiva, o leite é uma matriz complexa que apresenta proteínas, carboidratos e gorduras em sua composição (CHALUPA-KREBZDAK et al., 2018), com alto valor nutricional e precursor de diversos outros alimentos processados e até mesmo medicamentos (SALIM et al., 2022). Além disso, a indústria do leite apresenta significativa importância socioeconômica visto os diversos produtos e coprodutos gerados, assim como toda a cadeia produtiva envolvida desde o manejo dos animais, ordenha, coleta e processamento e distribuição do leite (ZUCARO et al., 2022; BARROS et al., 2022).

A qualidade microbiológica desse alimento depende, dentre outros fatores, da gestão adequada da cadeia do frio durante todas as etapas desde a ordenha, transporte, processamento e armazenamento para controlar a multiplicação de microrganismos no leite (BARBANO et al., 2006). Caso o ambiente de processamento e pós processamento apresentem higienização precária, pode ocorrer contaminação cruzada e os microrganismos psicotróficos serem reinseridos no leite e, assim, multiplicarem em

condições de refrigeração e isso os tornam especialmente responsáveis pela deterioração e segurança dos alimentos, visto que durante a produção, transporte, processamento e pós-compra muitos alimentos são acondicionados a frio (OLIVEIRA et al., 2015).

No processamento de leite e seus derivados, *Listeria monocytogenes* é uma espécie patogênica responsável pela listeriose, que pode causar gastroenterite leve ou infecções graves na corrente sanguínea e no sistema nervoso central, ou provocar até aborto, dependendo da suscetibilidade e resistência do organismo hospedeiro, alcançando uma letalidade que varia entre 20 a 30% em casos graves da listeriose (CARPENTIER e CERF, 2011). Além disso, representa uma grande preocupação na segurança microbiológica dos alimentos devido a sua capacidade de multiplicar em condições de refrigeração, abaixo de 0°C e por tolerar condições de estresse (BUCHANAN et al., 2017).

Nessa perspectiva, a contaminação por *L. monocytogenes* em alimentos ocorre comumente por meio do contato com superfícies de processamento contaminadas (FAGERLUND et al., 2017). A introdução deste microrganismo pode acontecer por várias rotas em ambientes de processamento de alimentos, sendo a maior incidência associada a locais úmidos, como correias transportadoras, ralos de piso e o interior dos equipamentos e tubulações (CARPENTIER e CERF, 2011; MØRETRØ e LANGSRUD, 2004). Essa permanência está associada à adesão dos microrganismos e a formação de biofilmes que conferem proteção e resistência contra a ação dos sanitizantes e das intempéries (LÓPEZ et al., 2010; GALIE et al., 2018).

Listeria innocua e *Listeria monocytogenes* têm sido isoladas dos mesmos alimentos e ambientes de processamento (COSTA et al., 2018) e devido à estreita relação genética e similaridade metabólica. *L. innocua* tem sido amplamente aplicada aos estudos conduzidos em plantas piloto ou em instalações de processamento de alimentos (SILVA-ÂNGULO et al., 2014; INANOGLU et al., 2021). Além disso, *Listeria* spp. pode apresentar alta resistência e, conseqüentemente, é capaz de sobreviver por longos períodos nos ambientes de processamento, principalmente em biofilmes (HAMMER et al., 2017; KABIR et al., 2021).

O biofilme consiste em células sésseis aderidas a suportes sólidos, com conseqüente produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa de polímeros altamente sistemáticos e organizados que imobiliza e protege as células

(DUFOR et al., 2010). Diversos fatores como pH, disponibilidade de nutrientes, *quorum sensing*, presença de compostos orgânicos, inorgânicos e temperatura influenciam a adesão dos microrganismos à superfície (OULAHAL et al., 2008).

Alguns autores consideram o número de microrganismos presentes na superfície como um parâmetro importante, capaz de determinar se há a formação de biofilme ou somente adesão bacteriana (OLIVEIRA et al., 2010). Segundo Andrade et al. (1998) para ser biofilme, é necessário um número mínimo de 10^7 UFC·cm⁻², enquanto Ronner e Wong (1993) consideram como biofilme um número de células aderidas de 10^5 UFC·cm⁻², já Wirtanen et al. (1996) caracterizaram biofilme com 10^3 UFC·cm⁻². Entretanto, mesmo que o número de células aderidas não configure um biofilme, já existe risco de contaminação microbiológica do alimento. Atualmente, a literatura define como biofilme agregados de células em que há presença de exopolissacarídeos (WANG et al., 2018; FERNANDES et al., 2021).

A higienização da planta de processamento é a chave para eliminar essa contaminação nos produtos industrializados. Uma maneira prática de higienizar sistemas de processamento em circuito fechado é por meio da tecnologia CIP (*clean in place*), na qual água, soluções de detergentes e sanitizantes são circulados no interior de tubos, vasos, equipamentos e acessórios, sem desmontá-los (FRIIS e JENSEN, 2002). O desempenho dessa tecnologia de higienização depende em geral do tipo de sujidade; do desenho da planta; do tempo de circulação da solução, do agente químico, da ação mecânica do fluido e da temperatura da solução de limpeza (SCHÖLER et al., 2012).

A literatura preconiza que o procedimento CIP seja realizado diariamente na indústria para garantir condições seguras de processamento (FERNANDES et al., 2021). Esse processo é executado com a realização das seguintes etapas: pré-enxágue, aplicação de detergente alcalino, enxágue do detergente, sanitização e enxágue final. O processo CIP diário inicia-se com pré-enxágue para remoção das sujidades grosseiras. Em seguida, a etapa com detergente alcalino é empregada a quente para solubilizar proteínas e gorduras. O enxágue intermediário visa remover as sujidades remanescentes que foram dissolvidas e o detergente residual. A sanitização tem como objetivo a destruição e remoção dos microrganismos. Por fim, o enxágue final é aplicado para remover o sanitizante residual do sistema (TETRA PAK, 2015).

Escrig et al. (2020) destacaram que embora os sistemas CIP sejam uma tecnologia padrão da indústria, ainda apresentam lacunas e demandam melhorias, como em regiões de difícil higienização. Essa realidade se deve às zonas de recirculação e estagnação de fluido associado às geometrias e ao design da tubulação (BLEL et al., 2008; FAILLE et al., 2018). Lelievre et al. (2002) relataram que expansões e contrações repentinas foram regiões que experimentaram bons níveis de higienização. Por outro lado, destacaram que expansões e contrações graduais foram formas classificadas como zonas mal limpas. Silva et al. (2020) discutiram a dificuldade da higienização nas zonas de estagnação e recirculação em geometrias *tê* e cotovelo e o impacto desse *layout* na higienização.

Nessa perspectiva, é notável a complexidade do processo CIP, de forma que a eficiência da higienização depende de muitos fatores, como a sujidade a ser removida, os agentes químicos empregados, o tempo de contato, a temperatura de aplicação, e as condições fluidodinâmicas do escoamento (SISLIAN et al., 2021). Os processos CIP são normalmente realizados com fluxo constante e envolvem a busca por estratégias para aumentar localmente a velocidade e o cisalhamento do fluido sobre as interfaces dos equipamentos e tubulações (LI et al., 2015).

A modelagem da dinâmica dos fluidos é usada para avaliar a capacidade de limpeza do sistema e apontar regiões de atenção no sistema. A ferramenta CFD (*Computational Fluid Dynamics*) é útil para monitoramento e previsão de regiões de difícil higienização (ASTERIADOU et al., 2008). No contexto da higienização CIP, o escoamento dos fluidos ocorre, fundamentalmente, de forma turbulenta e tridimensional (LI et al., 2019). Dessa forma, a modelagem do sistema deve considerar a complexidade da geometria 3D e verificar a adequação, vantagens e limitações dos modelos na previsão do escoamento do fluido (BOUVIER et al., 2014). Os modelos $k-\omega$ e $k-\varepsilon$ são usualmente implementados em escoamentos turbulentos e têm apresentado resultados similares (ASLAM BHUTTA et al., 2012).

Para aprimorar a fluidodinâmica em regiões com estagnação e recirculação de fluido, o fluxo pode ser aplicado de forma pulsada, alternativamente ao fluxo constante (ABSI e AZOUANI, 2018). Associado ao fluxo pulsado, as simulações computacionais auxiliam a explorar as características do pulso para melhoria da higienização em geometrias complexas. O fluxo pulsado é composto por um fluxo estacionário em que há sobreposição do movimento de fluido oscilante, mostrado na Fig. 3.1. A intensidade da

pulsação pode ser quantificada pelo adimensional de ondulação (W), calculado pela razão da oscilação máxima ($w_{os,max}$) e da velocidade do fluxo estacionário w_{stat} , (Augustin et al., 2010), como apresentado na Equação 3.1.

$$W = \frac{w_{os,max}}{w_{stat}} \quad (3.1)$$

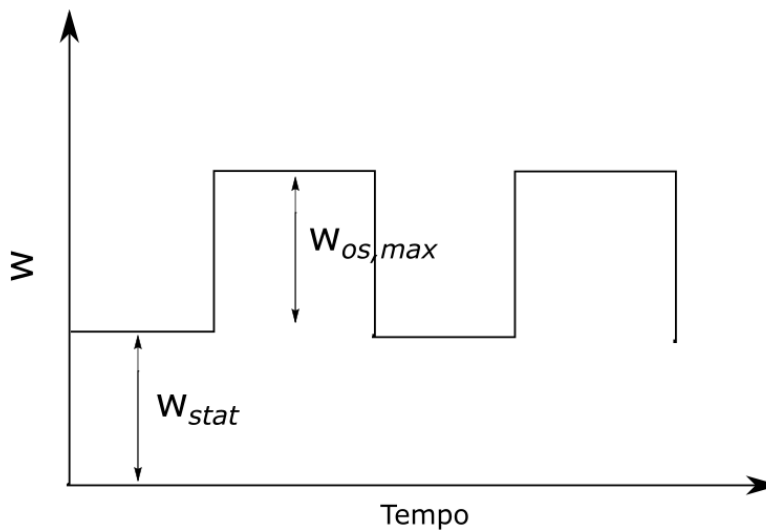


Figura 3.1 - Representação do fluxo pulsado e seus componentes.

Essa estratégia de pulsos é vantajosa, pois dispensa a aquisição de novos equipamentos e instalações. A execução do fluxo pulsado necessita apenas da adequação da lógica de controle do sistema de vazão na planta (SILVA et al., 2020). Além disso, aprimorar o processo é fundamental para indústria, já que a execução do processo CIP representa tempo de inatividade e redução da produção. Em termos ambientais gera efluentes residuais devido aos produtos químicos. Do ponto de vista energético, a higienização representa consumo energético nas unidades de processamento, sendo o processo CIP responsável por parte da energia gasta na indústria de produtos lácteos (LI et al., 2019).

Nesse contexto, este capítulo objetivou avaliar, comparativamente, a sanitização na higienização CIP, usando fluxo constante e fluxo pulsado em cinco geometrias, usualmente encontradas nas instalações de laticínios e contaminadas com *Listeria innocua*. Além disso, investigar o comportamento fluidodinâmico do escoamento nessas geometrias e determinar uma configuração ótima de operação empregando fluxo pulsado para redução do tempo de processo, melhoria nos níveis de higienização das superfícies de processamento e economia de insumos químicos e de energia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

Os estudos foram conduzidos utilizando suspensão bacteriana de *L. innocua* (ATCC 33090). Essa cultura estava liofilizada e a ativação foi realizada em *Brain Heart Infusion* (BHI, Merck, São Paulo, Brasil), três vezes consecutivas e incubadas em estufa tipo BOD (TECNAL), por 24 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Após três ativações, uma alíquota foi transferida para o leite integral UHT (Bonalat) de forma a produzir uma suspensão a 1% de inóculo, a qual era inserida no interior das geometrias para promover o processo de adesão. O número de microrganismos foi determinado por contagem total em placas utilizando ágar padrão para contagem (PCA, Kasvi, Itália) e o número de unidade formadoras de colônias inicial por mL foi de aproximadamente 10^8 UFC.mL^{-1} .

2.2 Adesão microbiana

Antes do processo de higienização CIP das superfícies em estudo, todas as geometrias foram previamente limpas com água potável e detergente líquido neutro e autoclavadas a 121°C por 30 min.

Posteriormente, as geometrias foram preenchidas com leite integral contendo a suspensão bacteriana, foram incubadas durante 12 h a 37°C , de acordo com a cinética de adesão determinada previamente. A incubação estática foi escolhida para garantir a homogeneidade da adesão na superfície e isolar os efeitos hidrodinâmicos conforme sugerido por Lelièvre et al. (2002) e Silva et al. (2020).

Após a incubação, o leite foi drenado e as geometrias foram instaladas na linha de circulação para serem submetidas ao processo CIP. Uma réplica da geometria utilizada na higienização foi selecionada para a contagem inicial de células na superfície. Essa geometria foi preenchida com água peptonada (Acumedia, Lansing, Estados Unidos) 0,1% (m/v), a qual permaneceu no interior da superfície, por 1 min e em seguida descartada, para remoção das células planctônicas.

As células sésseis foram removidas com auxílio de um *swab* e transferidas para uma solução de água peptonada 0,1% (m/v) onde permaneceu por 2 min em agitação em vórtex

(Velp, Wizard Advanced IR) para a liberação das células para a solução. Após essa etapa, diluições seriadas foram preparadas e plaqueadas, pelo método *pour plate*, em ágar padrão para contagem (PCA – Kasvi, Itália). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C. O resultado da contagem foi expresso em UFC.cm⁻², empregado a Equação 3.2:

$$Contagem[UFC \cdot cm^{-2}] = \frac{NV_R}{V_D A} \quad (3.2)$$

em que: *C*: contagem média do número de colônias após incubação [UFC]; *V_R*: Volume usado na *rinsagem* [mL]; *V_A*: Volume usado para plaqueamento da amostra [mL]; *A*: área da geometria [cm²].

2.3 Unidade experimental

O sistema utilizado neste estudo foi descrito por Silva et al. (2020). Uma tubulação com estrutura e características similares às usadas em unidades de processamento de laticínios foi usada, sendo em aço inoxidável AISI 304, grau de polimento #4. O protótipo da linha de circulação é apresentado na Fig 3.2.

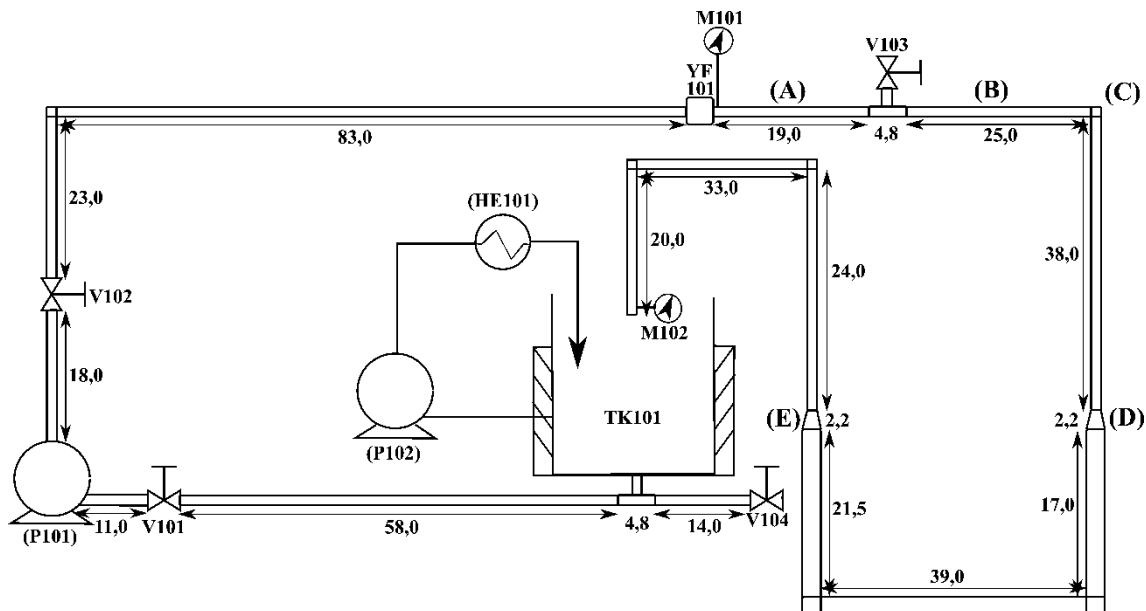


Figura 3.2-Representação esquemática da linha de circulação.

Legenda: TK – tanque de armazenamento de leite e soluções de limpeza (capacidade de 25 L); V – válvulas de bloqueio tipo esfera com conexão roscada de ½”; P – bomba centrífuga para promover a circulação de fluidos e agentes de limpeza no sistema; YF - sensor de vazão da turbina ½”, M - manômetro de tubo em U, HE - trocador de calor, superfícies de diferentes geometrias: seção cilíndrica reta (A), tê (B), cotovelo (C), expansão (D) e redução (E).

A linha era composta por seções com extremidades rosqueáveis, que permitem a desmontagem e amostragem da superfície das geometrias em investigação. As seções de teste estudadas foram: trecho cilíndrico reto (A), tê (B), cotovelo (C), expansão ½” para 1” (D) e redução 1” para ½” (E) usualmente encontrados nas linhas de circulação e apresentam diferentes intensidades de cisalhamento. O sistema de controle da vazão utilizou controlador PID e configurado no ambiente Arduino conforme descrito por Silva et al. (2019).

2.4 Fluxo pulsado

Os pulsos foram produzidos pela variação da vazão proporcionada pela bomba centrífuga (P 101), a qual estava acoplada a um inversor de frequência (SY 101) (Figura 3.2). A sintonia do controlador para geração dos pulsos foi descrita por Silva et al. (2019). As condições foram inseridas no console do controlador de acordo com cada configuração proposta. Na Tabela 3.1 é apresentada a condição de fluxo, a ondulação (W), as velocidades e os valores do número de Reynolds (Re) correspondente.

Tabela 3.1 - Configuração do fluxo pulsado na sanitização CIP.

W (-)	Velocidade ($m \cdot s^{-1}$)	Re (-)
0,5	1,20 para 1,80	18941 para 28412
1,0	1,00 para 2,00	15784 para 31568
1,5	0,86 para 2,14	13529 para 33823
2,0	0,75 para 2,25	11838 para 35514

2.5 Simulação CFD

2.5.1 Teste de independência de malha computacional

A criação da geometria e a aplicação da malha foram criadas usando o *software Gambit*. O resolvidor numérico foi feito no *ANSYS Student*. A densidade de células na malha foi determinada aumentando a quantidade de células até que a queda de pressão entre a entrada (M101) e saída do sistema (M102) tornasse constante. Os dados obtidos são apresentados na Fig. 3.3. As malhas são compostas principalmente de células hexaédricas 3D.

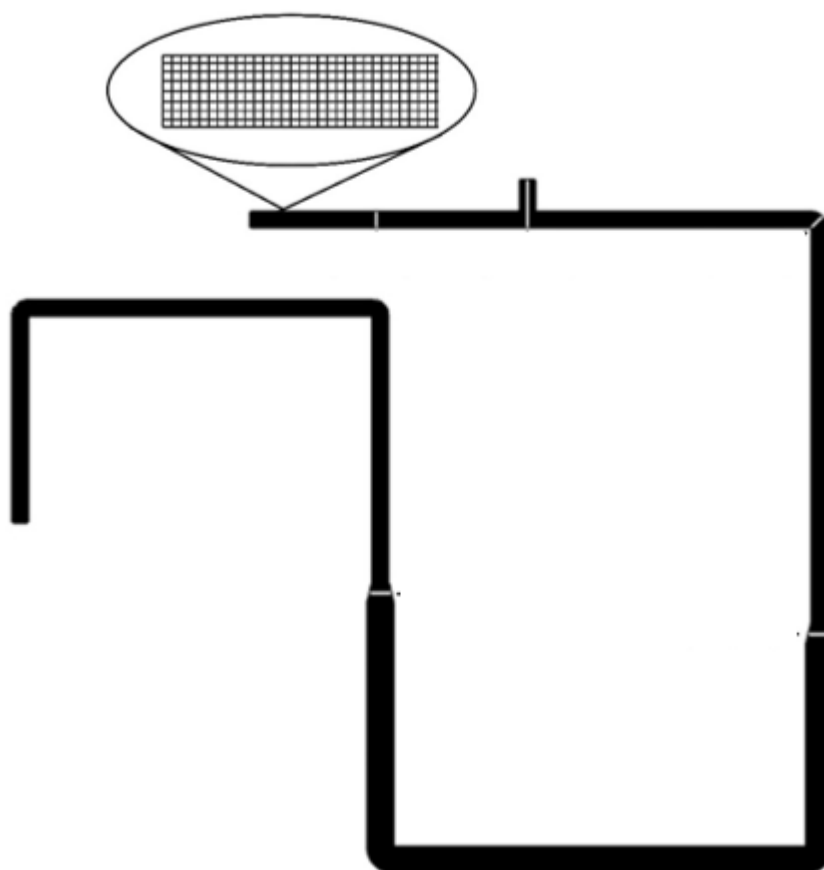


Figura 3.3 - Representação do *layout* da tubulação e aplicação da malha.

Para resolução, a condição de contorno na extremidade lateral esquerda do tubo disposto na posição horizontal foi definida uma entrada do tipo *velocity inlet*. Nessa condição de contorno, a velocidade foi informada por meio de uma UDF (*User-defined functions*), na qual foram programadas as condições para produzir os pulsos. Na saída, ao final do trecho reto vertical, foi especificada a condição de saída *pressure outlet* como pressão atmosférica. Dessa forma, em relação a pressão relativa (*pressure gauge*) foi adotado o valor nulo para as simulações.

Os fluidos utilizados no processo CIP foram água e soluções aquosas de agentes químicos de limpeza como NaOH e sanitizante, o ácido peracético. Dessa forma, as propriedades da solução dos agentes de higienização foram assumidas iguais as da água, como sugerido por Yang et al. (2018). Foi escolhida uma malha de 19409 células, pois forneceu resultados suficientemente precisos. O uso de uma malha mais refinada não melhorou significativamente o resultado e apresentou maior tempo de simulação. A influência da discretização da geometria em função da queda de pressão no sistema é apresentada na Fig. 3.4.

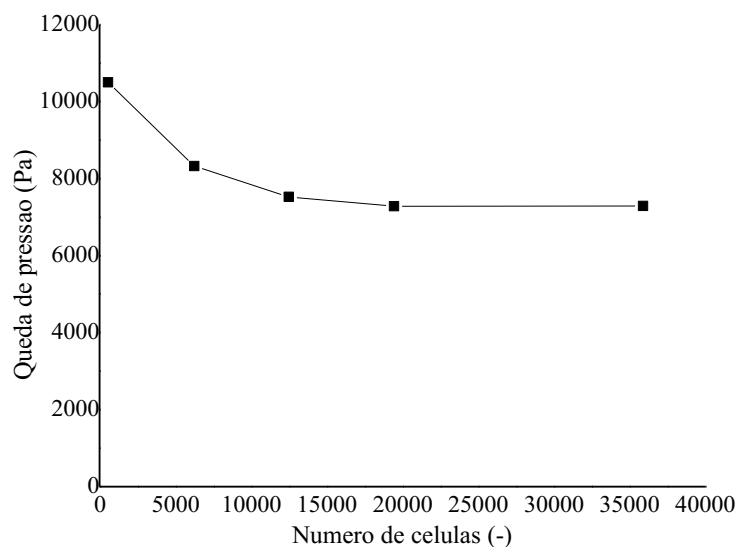


Figura 3.4 - Queda de pressão em função do número de células na discretização da geometria.

2.5.2 Modelo de turbulência

Diversos modelos de turbulência estão disponíveis e foram implementados para representar os escoamentos de fluidos (Bouvier et al., 2014). O modelo de turbulência $k-\varepsilon$ pode apresentar limitações, mas algumas vantagens, como o desempenho computacional e aptidão para alcançar a convergência. Já o modelo de turbulência $k-\omega$ de transporte de tensão de cisalhamento tem muitas melhorias em relação ao modelo $k-\varepsilon$. Esses dois modelos foram testados e comparados com os valores experimentais usando a curva de atrito do sistema.

Foi empregado no parâmetro operacional de solução de acoplamento pressão/velocidade a configuração *Coupled*. Na estratégia de interpolação, o método utilizado foi *Second order*. Os fatores de relaxação foram empregados na forma *Default*. Por último, o critério de convergência da solução de 10^{-4} .

2.5.3 Validação do modelo

A validação do modelo de turbulência foi realizada comparando a curva experimental com resultados obtidos por computação CFD para curva do fator de atrito ($f/2$), válida para fluidos newtonianos em função do número de Reynolds (Re), conforme apresentado na Equação 3.3.

$$\frac{f}{2} = \frac{|\Delta P| d}{4L\rho v^2} \quad (3.3)$$

Os experimentos foram realizados utilizando água potável a uma temperatura constante. O número Reynolds foi calculado conforme apresentado na Equação 3.4.

$$Re = \frac{\rho v d}{\mu} \quad (3.4)$$

sendo L o comprimento da tubulação de aço inoxidável, ΔP , a queda de pressão observada entre os manômetros M101 e M102, ρ a densidade da solução sanitizante, v a velocidade média do escoamento, d o diâmetro da tubulação e μ a viscosidade dinâmica da solução sanitizante.

De acordo com comportamento do fator $f/2$, mostrado na Fig. 3.5, observou-se que o modelo $k-\omega$ apresentou melhor ajuste aos dados experimentais. Dessa forma, o modelo SST $k-\omega$ foi selecionado para as simulações fluidodinâmicas deste trabalho.

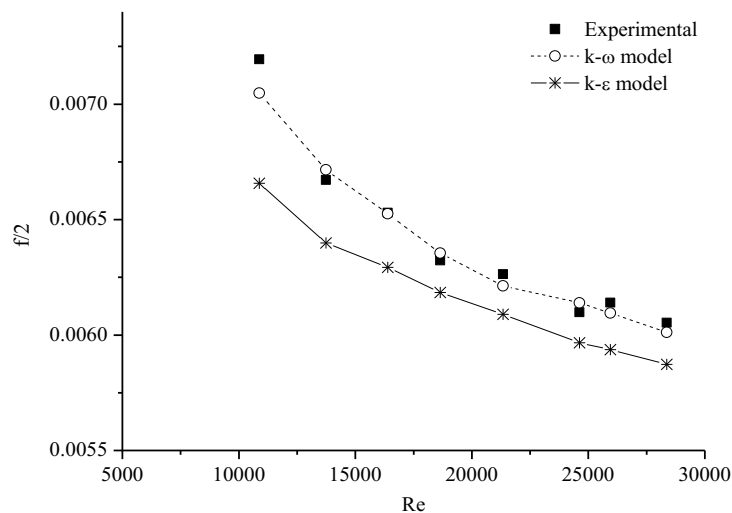


Figura 3.5 - Curvas do fator de atrito experimental e calculado para os modelos de turbulência.

2.6 Higienização

Após as geometrias serem submetidas à contaminação, elas foram instaladas na linha de circulação para a execução da higienização CIP, tradicionalmente executada,

diariamente, na indústria de laticínios e que compreende as seguintes etapas: pré-enxágue, detergente alcalino, enxágue, sanitização e enxágue final.

Primeiramente, preencheu-se o tanque de armazenamento (TK 101) com água potável da rede de distribuição a temperatura ambiente para o pré-enxágue. Iniciou-se a circulação da água em circuito aberto por 5 min para remoção de resíduos de leite. Todas as etapas do procedimento foram executadas com velocidade média de $1,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ conforme o usual e recomendado pela literatura (TAMINE, 2008; ANDRADE 2008) para higienização de tubulações, produzindo assim número de Reynolds igual a 23700.

Ao final do pré-enxágue, deu-se início a limpeza alcalina com a circulação do detergente NaOH a 1% (m/v) em circuito fechado durante 15 min conforme sugerido por Andrade (2008) e a temperatura de 70°C conforme indicado pela Tetra Park (2015) para procedimento CIP de tubulações. O enxágue do detergente alcalino foi realizado com água potável em circuito aberto para remoção do NaOH residual. O enxágue foi finalizado quando a condutividade do efluente da tubulação era equivalente à condutividade da água de alimentação no valor de $200 \pm 12 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

A sanitização convencional foi realizada com ácido peracético a temperatura ambiente durante 15 min, com concentração a 100 ppm (ANDRADE, 2008; COSTA et al., 2017) em circuito fechado de circulação do sanitizante. Por fim, realizou o enxágue com água potável em circuito aberto durante 5 min para remoção do sanitizante residual. Já a sanitização com fluxo pulsado foi delineada por meio de planejamento composto central, conforme descrito no tópico 2.7 deste capítulo.

A eficácia do processo foi determinada de acordo com Sharma e Anand (2002), Kumari e Sakar (2014) e Silva et al. (2020). A quantificação de células sobreviventes após o processo CIP foi determinada pela técnica *swab*, com diluições seriadas em água peptonada (Acumedia, Michigan) e plaqueamento com PCA. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h, e as colônias foram contadas e expressas como $\log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$. A Redução Decimal (RD) de células aderidas nas geometrias foi calculado com base na Equação 3.5.

$$RD = \log N - \log n \quad (3.5)$$

em que N representa a contagem inicial de células na superfície ($\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) e n a contagem de ($\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) após o processo CIP.

2.7 Delineamento experimental

O planejamento composto central (PCC) foi utilizado para investigar a influência das quatro variáveis independentes (tempo, ondulação e período e concentração de sanitizante) participantes da sanitização com fluxo pulsado no processo de higienização CIP alternativo.

A técnica de superfície resposta foi utilizada para descrever o comportamento da redução decimal das células de *L. innocua* aderidas à superfície das geometrias em função das variáveis do processo. Para analisar o planejamento fatorial, as variáveis reais foram transformadas em unidades codificadas, de acordo com a Equação 3.6. O nível baixo, médio e alto de cada variável codificada foram respectivamente -1 (baixo), 0 (médio) e +1 (alto). Os pontos axiais α foram designados iguais a ± 2 , configurando um planejamento ortogonal. Os 19 experimentos foram dispostos em dois blocos e realizados de maneira aleatória para minimizar erros.

$$X_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\Delta x} \quad (3.6)$$

em que X_i é o valor codificado da i -ésima variável, x_i o valor atual da variável em unidade real, $\bar{x}$ valor médio da variável em unidades reais, Δx diferença entre o valor médio atual e o valor atual

Os níveis e intervalos dos fatores analisados para cada variável são apresentados na Tab. 3.2.

Tabela 3.2 - Níveis das variáveis investigadas na sanitização CIP pulsada.

Fator	Unidade	Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)	- α	+ α
Tempo	min	6	9	12	3	15
Ondulação	-	0,5	1	1,5	0,0	2,0
Período	s	45	60	75	30	90
Concentração	mg·L ⁻¹	40	60	80	20	100

A resposta foi expressa em termos de redução log. O software *Statistica* foi usado para projetar e analisar a matriz experimental e para avaliar o efeito dos fatores sobre a

eficiência da sanitização. Na Tabela 3.3 é apresentado os 19 experimentos projetados em termos das variáveis codificadas e das variáveis reais.

Tabela 3.3 - Matriz planejamento para sanitização pulsada no processo CIP.

Exp.	Variáveis codificadas				Variáveis reais			
	A	B	C	D	Tempo [min]	Ondulação [-]	Período [s]	Concentração [mg·L ⁻¹]
1	1,00	1,00	1,00	-1,00	12	1,5	75	40
2	1,00	1,00	-1,00	-1,00	12	1,5	45	40
3	1,00	-1,00	1,00	1,00	12	0,5	75	80
4	-1,00	1,00	-1,00	1,00	6	1,5	45	80
5	1,00	-1,00	-1,00	1,00	12	0,5	45	80
6	-1,00	-1,00	1,00	-1,00	6	0,5	75	40
7	-1,00	1,00	1,00	1,00	6	1,5	75	80
8	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	6	0,5	45	40
9	0,00	0,00	0,00	0,00	9	1,0	60	60
10	-2,00	0,00	0,00	0,00	3	1,0	60	60
11	2,00	0,00	0,00	0,00	15	1,0	60	60
12	0,00	-2,00	0,00	0,00	9	0,0	60	60
13	0,00	2,00	0,00	0,00	9	2,0	60	60
14	0,00	0,00	-2,00	0,00	9	1,0	30	60
15	0,00	0,00	2,00	0,00	9	1,0	90	60
16	0,00	0,00	0,00	-2,00	9	1,0	60	20
17	0,00	0,00	0,00	2,00	9	1,0	60	100
18	0,00	0,00	0,00	0,00	9	1,0	60	60
19	0,00	0,00	0,00	0,00	9	1,0	60	60

2.8 Consumo energético do bombeamento

A energia elétrica gasta (δ) para bombeamento das soluções químicas no CIP de referência e no processo pulsado foram determinados conforme proposto por Silva et al. (2020) e apresentado na Equação 3.7.

$$\delta_{\text{eletricidade}} = \sqrt{3}V_L \cos \theta \int_0^t I_L(t) dt \quad (3.7)$$

em que, V_L é a tensão na linha [V]; θ ângulo de fase, I_L é a corrente na linha [A].

2.9 Análise estatística

Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com intervalos de confiança de 95% para determinar a significância dos efeitos. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o *software* estatístico *Statistica 7.0*.

2.10 Otimização multivariável

As condições ideais globais para otimizar o processo de sanitização pulsada foram determinadas pela técnica da desejabilidade para as seis respostas associada por meio da técnica de Evolução Diferencial. Cada resposta prevista por meio do modelo estatístico e a resposta experimental podem ser transformadas em uma desejabilidade d_i .

A desejabilidade d_i varia de 0 a 1, onde 0 representa uma resposta completamente indesejável e $d_i = 1$ representa a resposta ideal. As desejabilidades individuais d_i são então combinadas usando média geométrica, em uma única desejabilidade global D , que é otimizada para encontre o conjunto ideal de condições que proporcione as maiores remoções de células e maior economia em relação ao tempo, ao sanitizante e a energia, conforme indicado de forma genérica pela Equação 3.8.

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{\frac{1}{n}} \quad (3.8)$$

com n denotando o número de respostas.

A função desejabilidade assume formatos específicos de acordo com interesse de maximização ou minimização. A desejabilidade individual da resposta a ser maximizada é definida como mostrado na Equação 3.9.

$$d_i = \begin{cases} 0 & \text{se, } Y_i < L_i \\ \left[\frac{Y_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^s & \text{se, } L_i < Y_i < T_i \\ 1 & \text{se, } Y_i > T_i = U_i \end{cases} \quad (3.9)$$

Para a minimização de uma resposta, a função de desejabilidade é definida na Equação 3.10:

$$d_i = \begin{cases} 1 & \text{se, } Y_i < T_i = L_i \\ \left[\frac{Y_i - U_i}{T_i - U_i} \right]^s & \text{se, } U_i < Y_i < T_i \\ 0 & \text{se, } Y_i > U_i \end{cases} \quad (3.10)$$

sendo, L_i , U_i e T_i os valores inferior, superior e alvo, respectivamente, que são desejados para a resposta com $L_i \leq T_i \leq U_i$. O expoente s é o peso determina o quão importante é obter o valor alvo T_i . Para $s = 1$, a função aumenta linearmente em direção a T_i . Grandes valores de s devem ser selecionados se for muito desejável que o valor predito estar próximo de T_i ou aumentar rapidamente acima de L_i . Por outro lado, pequenos valores de s devem ser escolhidos se qualquer valor predito acima de L_i e abaixo de U_i for aceitável ou se valores consideravelmente acima de L_i não são de importância crítica. O sistema de equações foi implementado na plataforma *Google Colab* para realizar a determinação do ponto ótimo por meio da técnica da desejabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Adesão microbiana na superfície das geometrias

A adesão da *Listeria innocua* na superfície das geometrias foi de $5,86 \pm 0,18 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. A adesão entre as cinco geometrias não foi estatisticamente diferente. Costa et al. (2018) mostraram que o desenvolvimento de *L. innocua* em uma unidade de produtos lácteos alcançou valores similares aos encontrados neste trabalho. A adesão foi de 6,20 a 6,69 $\log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ e comparativamente à *L. monocytogenes* que apresentou adesão de 5,65 a 6,74 $\log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ não havendo diferença estatística entre a adesão para as duas espécies para superfície de aço inoxidável. Além disso, Koo et al. (2014) mostraram que a presença de *L. innocua* influencia o desenvolvimento e adesão de *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável, alcançado em 24 h essa co-cultura uma adesão de $5,33 \pm 0,41 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, valor similar aos níveis observados neste trabalho.

3.2 Higienização tradicional

Na Tabela 3.4 são apresentados os valores da redução decimal observados em cada geometria após a execução da higienização CIP tradicional.

Tabela 3.4 - Redução decimal de células em cada geometria.

Geometria	Redução decimal [-]
Trecho Reto (A)	$5,57 \pm 0,29^a$
Tê (B)	$2,86 \pm 0,20^c$
Cotovelo 90° (C)	$4,51 \pm 0,10^b$
Expansão (D)	$4,84 \pm 0,44^{bd}$
Redução (E)	$5,28 \pm 0,26^{ad}$

^{a,b,c,d} Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si ($p > 0,05$).

O trecho reto cilíndrico e a redução gradual foram as geometrias que apresentaram maiores reduções decimais, de forma que não houve diferença significativa entre essas duas geometrias. Seguido do trecho reto e da redução, o cotovelo e expansão foram as formas que apresentaram a segunda maior redução decimal na contagem de células de *L. innocua*. Estatisticamente, observou-se que não houve diferença significativa na redução entre as geometrias expansão e redução. Por último, a parte da tubulação na forma de tê apresentou a menor redução decimal de células quando comparada as demais.

Trabalhos no mesmo protótipo executados por Silva et al. (2020) mostrou que o escoamento na tubulação cilíndrica ocorreu de forma uniforme por toda a geometria e consequentemente produziu a mesma velocidade de $1,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. A tensão de cisalhamento nas paredes da superfície foram de aproximadamente 6,5 Pa, a qual associada a ação do sanitizante promoveu a remoção e destruição das que estavam fixadas na superfície do aço inoxidável. Lelièvre et al. (2002) mostraram que a tensão cisalhante média tem efeito significativo na remoção de células de *B. cereus* aderidas à superfície de aço inoxidável e que de modo geral, o trecho reto apresentou melhores níveis de remoção.

No interior da curva 90° notou-se a formação de um caminho preferencial próximo à concavidade menor da geometria. Nesse ponto, o escoamento ocorreu com maiores velocidades de aproximadamente $2,3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ e cisalhamento a 6,3 Pa.. O lado oposto, próximo à concavidade maior, foi submetido a menores velocidades de $0,8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ que produziu um cisalhamento de 2,0 Pa. Devido ao menor cisalhamento, ocorreu menor destruição e remoção das células, o que justifica a menor sanitização em comparação ao trecho cilíndrico reto.

Os acessórios de tubulação na forma de expansão e redução são usualmente empregados nas indústrias de alimentos (BLEL et al., 2007) para adaptação do diâmetro da tubulação. A velocidade média de aproximadamente $1,1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ na região da linha de centro da geometria. A tensão cisalhante aplicada nessa região variou de 2,5 a 4,4 Pa e não produziu diferenças significativas nos níveis de higiene produzidos pelo processo CIP quando comparados a tubulação em trecho reto e cotovelo respectivamente. Apesar disso, Lelièvre et al. (2002) destacaram a ocorrência de baixas velocidades onde ocorre o turbilhão do fluido na seção cônica e classificaram essas formas como regiões de difícil higienização, visto que a tensão de cisalhamento nestes pontos localizados é baixa e não uniforme ao longo da geometria.

No estudo da higienização CIP de *P. fluorescens*, Silva et al. (2020) apontaram na ramificação em T a existência de uma zona de estagnação com recirculação de fluido a baixas velocidades, na ordem de $0,3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Em consequência disso, sobre essa superfície foi aplicado cerca de 0,9 Pa de tensão, menor do que aquela observada no trecho reto. Jensen et al. (2007) explicaram que o escoamento gera uma força tangencial local agindo sobre a interface líquido-superfície e atua como um transportador de produtos químicos. Paz et al. (2013) indicaram a tensão de cisalhamento como um parâmetro mais expressivo na remoção local do que a velocidade.

Li et al. (2019) destacaram que as baixas velocidades e lentas taxas de troca de fluido em comparação com a corrente principal torna essas regiões mais difíceis de higienizar. Jensen e Friis (2005) relataram que as regiões mais difíceis de limpar são trechos sem saída e fendas na geometria que produzem zonas de recirculação e estagnação. Esse cenário ocasiona a baixa tensão de cisalhamento e menor transferência de massa dos agentes químicos acarretando uma redução da eficiência.

No entanto, vale destacar que nem sempre esse comportamento ocorre nos sistemas de tubulação. Dev et al. (2014) trabalharam na higienização CIP de uma tubulação de ordenhas de leite cru e relataram que o cotovelo foi uma geometria mais difícil de higienizar em comparação ao trecho reto. Figueiredo et al. (2009) mostraram diferença significativa na remoção de *P. aeruginosa* entre as geometrias cilíndrica reta e o cotovelo, mas destacaram que as reduções de células foram maiores no trecho T em comparação ao trecho reto da tubulação. Essa diferença está relacionada ao *layout* da tubulação, ao posicionamento das geometrias na linha e ao fluxo que foram submetidos.

3.3 Higienização CIP pulsada

A higienização CIP com sanitização pulsada foi executada para cada condição experimental proposta e os resultados da redução decimal de cada geometria e o consumo energético é apresentado na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Redução decimais em cada geometria e consumo de energia para cada configuração de pulso na sanitização.

Exp.	Variáveis codificadas				Respostas					
	A	B	C	D	Redução decimal [-]					Energia [kJ]
					TR	TÊ	COT	EXP	RED	
1	1,00	1,00	1,00	-1,00	4,92	1,87	4,35	5,81	4,87	160,32
2	1,00	1,00	-1,00	-1,00	5,01	2,2	4,43	5,63	5,26	177,95
3	1,00	-1,00	1,00	1,00	5,27	2,28	3,64	5,94	6,01	132,31
4	-1,00	1,00	-1,00	1,00	4,13	2,45	2,79	5,40	5,33	85,86
5	1,00	-1,00	-1,00	1,00	5,60	2,53	4,67	5,22	5,97	147,02
6	-1,00	-1,00	1,00	-1,00	4,69	2,38	4,72	5,71	5,87	63,93
7	-1,00	1,00	1,00	1,00	4,10	2,82	6,13	5,96	5,96	88,06
8	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	4,69	2,49	6,30	5,51	6,03	75,14
9 (C)	0,00	0,00	0,00	0,00	6,02	3,6	5,83	6,12	6,01	131,90
10	-2,00	0,00	0,00	0,00	4,69	1,69	5,02	5,17	5,50	39,70
11	2,00	0,00	0,00	0,00	4,89	3,19	5,39	5,84	6,42	185,66
12	0,00	-2,00	0,00	0,00	5,24	2,67	4,13	5,07	5,79	77,17
13	0,00	2,00	0,00	0,00	5,92	2,86	4,29	5,28	5,64	133,98
14	0,00	0,00	-2,00	0,00	4,70	3,32	5,30	5,59	5,99	128,44
15	0,00	0,00	2,00	0,00	4,98	2,9	5,05	6,32	6,02	112,53
16	0,00	0,00	0,00	-2,00	3,34	1,83	3,26	5,79	4,34	121,08
17	0,00	0,00	0,00	2,00	4,19	2,52	5,39	5,89	5,58	121,44
18 (C)	0,00	0,00	0,00	0,00	5,71	4,04	6,17	6,30	6,29	124,14
19 (C)	0,00	0,00	0,00	0,00	5,37	3,96	6,30	6,01	5,92	134,31

A análise da variância (ANOVA) para a higienização da tubulação em trecho cilíndrico reto com fluxo pulsado são apresentados na Tabela 3.6. Os resultados foram utilizados na avaliação da significância dos fatores e construção do modelo quadrático.

Tabela 3.6 - Análise da variância (ANOVA) para redução decimal no quantitativo de *Listeria innocua* aderida à superfície interna das geometrias.

Fator de variância	Valores de F e efeito de variáveis independentes									
	TR		TE		COT		EXP		RED	
	df	F	df	F	df	F	df	F	df	F
Linear										
A	-	-	1	19,50 ^a	-	-	1	32,03	1	30,94
B	1	6,70 ^a	-	-	-	-	1	6,24	-	-
C	-	-	-	-	-	-	1	87,13	-	-
D	1	10,31 ^a	1	6,88	1	48,35	-	-	1	56,13
Quadrático										
A ²	1	30,24 ^a	1	53,98	1	25,08	1	72,73	-	-
B ²	-	-	1	33,71	1	104,59	1	168,15	1	11,20
C ²	1	26,69 ^a	1	17,38	1	26,35	1	5,38	-	-
D ²	1	147,09 ^a	1	74,02 ^a	1	92,47	1	15,47	1	132,37
Cruzado										
A,B	1	6,48 ^a	-	-	1	62,26	-	-	1	6,99
A,C	-	-	-	-	1	21,86	-	-	1	6,18
A,D	1	21,33 ^a	-	-	1	7,19	-	-	1	56,25
B,C	-	-	-	-	1	91,77	-	-	-	-
B,D	1	36,15 ^a	1	19,66 _a	1	21,87	1	15,66	1	39,04
C,D	-	-	-	-	1	42,23	1	14,64	1	13,53
Erro	10		11		7		9		9	
R ²		0,9574		0,9213		0,9827		0,973		0,9727
R ² -adj		0,9232		0,8711		0,9554		0,9485		0,9455

3.3.1 Trecho reto

Os termos não significativos foram eliminados e os dados estatísticos foram obtidos usando regressão. Todas as variáveis estudadas no processo de sanitização: tempo, ondulação, período do pulso e concentração do ácido peracético foram significativos na redução das células aderidas na superfície do trecho cilíndrico reto. O modelo predito para redução decimal com R^2 igual a 0,9574 é apresentado na Equação 3.11, indicando que o modelo ajustado pode ser usado para descrever a variação nos dados.

$$RD = 5,66 - 0,21 \cdot A^2 + 0,17 \cdot B - 0,20 \cdot C^2 + 0,21 \cdot D - 0,47 \cdot D^2 + 0,24 \cdot A \cdot B + 0,43 \cdot A \cdot D - 0,40 \cdot B \cdot D \quad (3.11)$$

A redução média observada no ponto central foi de 5,66. Os coeficientes positivos nos efeitos cruzados, relacionados ao tempo, mostraram que maiores tempos de circulação da solução sanitizante associados às maiores ondulações e às maiores concentrações de ácido peracético provocaram maiores reduções no quantitativo de células na superfície do trecho cilíndrico. Por outro lado, o termo quadrático do tempo mostrou uma saturação na destruição e remoção das células em função do tempo de contato. Nessa perspectiva, os valores intermediários de tempo de contato do sanitizante com a superfície contaminada produziram as maiores reduções decimais na contagem de células, conforme mostrado nas superfícies de resposta das Fig. 3.6A, 3.6B e 3.6C.

Em relação as ondulações, observou-se com base no coeficiente linear positivo da ondulação e o efeito da ondulação associado ao tempo e a concentração. As ondulações com $W > 1$ causaram as maiores reduções decimais no quantitativo de *L. innocua* após a sanitização, conforme representado nas superfícies de resposta das Fig. 3.6A, 3.6D e 3.6E. Foste et al. (2013) destacaram que quando $W > 1$ ocorre a separação da subcamada viscosa e à formação de redemoinhos próximo à parede e pode diminuir a espessura da subcamada laminar na superfície. Além disso, no fluxo pulsado o máximo temporário de velocidade não ocorre necessariamente no centro do tubo, mas perto da parede, resultando em maiores tensões de cisalhamento, o que contribuiu para remoção mecânica das células aderidas.

Além disso, Blel et al. (2009) mostraram que o fluxo pulsado aplicado na higienização CIP de um tubo cilíndrico aumentou a tensão de cisalhamento na parede. A mudança direcional do fluxo também pode aumentar as taxas de transferência de massa e consequentemente potencializar o transporte do agente sanitizante até as células de *Listeria* aderidas à tubulação. Esse comportamento foi relatado por Silva et al. (2020), que destacaram o efeito positivo da ondulação na sanitização de trechos cilíndricos retos de tubulações de processamento de leite cru.

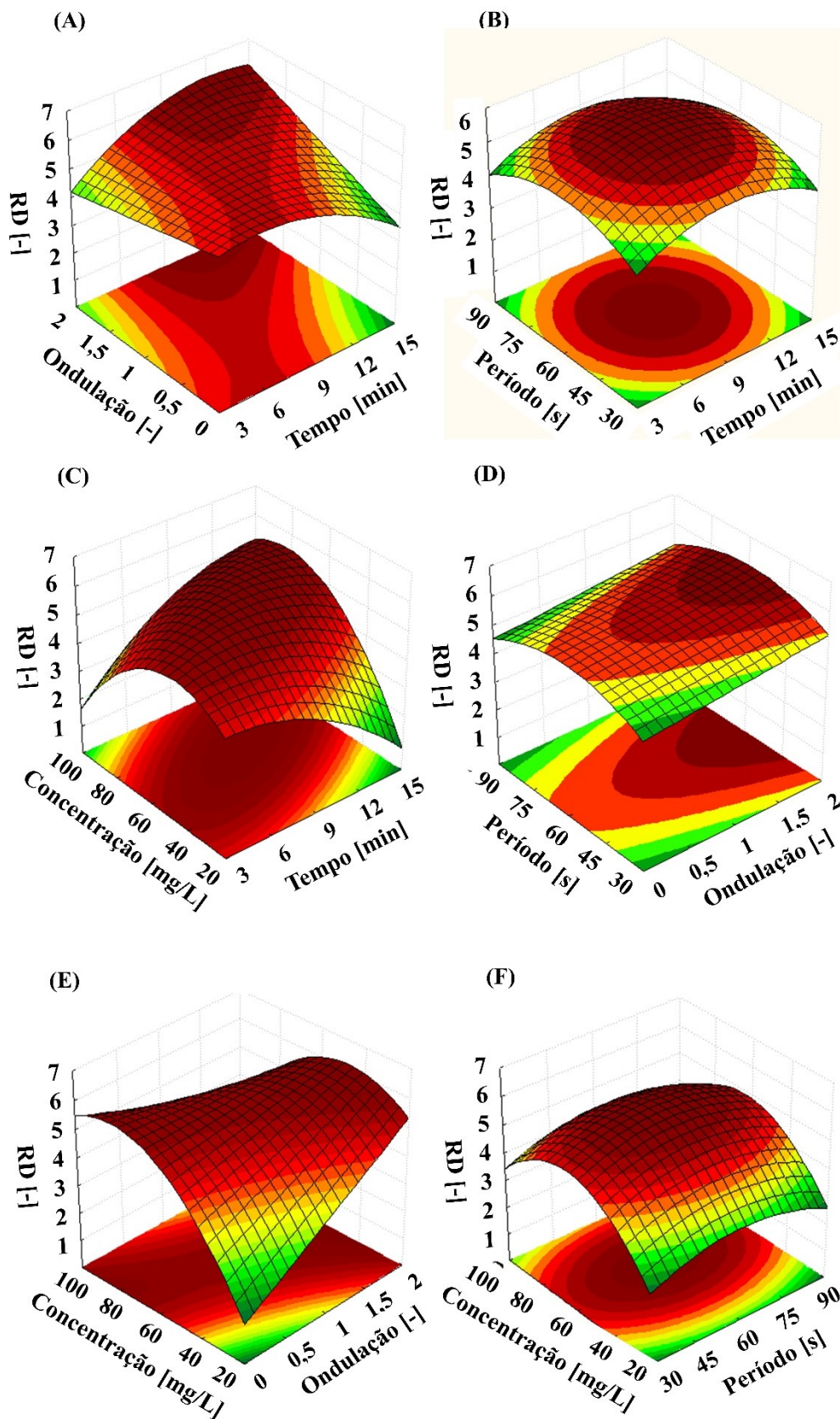


Figura 3.6 - Superfície Resposta para redução decimal no trecho cilíndrico reto em função das variáveis: tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.

O coeficiente negativo associado ao termo quadrático do período indicou que existia um ponto de máxima na remoção e destruição das células relacionado a duração do pulso. Essa região de máximo apresenta-se próximo ao ponto central, de acordo com as superfícies de resposta das Fig. 3.6B, 3.6D e 3.6F. Lelievre et al. (2002) demonstraram que a taxa de flutuação na tensão de cisalhamento contribui para a remoção de células na superfície de tubulações. Li et al. (2019) compilou informações que mostraram que a variação na tensão de cisalhamento é um parâmetro chave para bons níveis de limpeza. A variação na flutuação da tensão de cisalhamento também foi relatada como um agente benéfico para melhoria do procedimento CIP por Li et al. (2017).

A contribuição do agente químico na remoção e destruição das células é expressa pelo coeficiente linear positivo associado a concentração do sanitizante. Dessa forma, o aumento da concentração promoveu maiores reduções, conforme observado na superfície de resposta da Fig. 3.6C. No entanto, o coeficiente negativo do termo quadrático da concentração mostrou uma saturação nessa contribuição, assim como o efeito cruzado do pulso associado à concentração, Fig. 3.6E. Essa interação entre força mecânica e ação química também foi relatada por Hall (1998) na remoção de biofilme de *P. fragi*.

3.3.2 Tê

Os resultados obtidos com teste ANOVA para geometria tê com fluxo pulsado são apresentados na Tabela 3.6. Todas as variáveis estudadas no processo de sanitização tempo, ondulação, período do pulso e concentração do ácido peracético foram significativos na redução das células aderidas na superfície. O modelo predito para redução decimal com R^2 igual a 0,9213 é apresentado na Equação 3.12.

$$RD = 3,87 + 0,38 \cdot A - 0,39 \cdot A^2 - 0,31 \cdot B^2 - 0,22 \cdot C^2 + 0,16 \cdot D - 0,45 \cdot D^2 + 0,53 \cdot B \cdot D \quad (3.12)$$

Baseado na Equação 3.12, observou-se uma redução decimal média na remoção das células na condição do ponto central igual a 3,87. O coeficiente linear do tempo indicou que o aumento do tempo de sanitização contribuiu para maior redução decimal das células aderidas. No entanto, o termo quadrático negativo associado ao tempo mostrou que há um máximo na remoção sob influência do tempo.

O coeficiente negativo associado à ondulação indicou que existe um máximo associado à remoção e destruição das células por meio do cisalhamento do fluxo e ao efeito anular do pulso. Essa região encontra-se em torno do ponto central (Fig. 3.8A e Fig. 3.8D) e consequentemente condição de ondulação com $W=1$. Nessa condição de

pulso, a velocidade máxima não ocorre necessariamente no centro da geometria e intensidade do escoamento dentro da zona de estagnação aumenta momentaneamente conforme mostrado na Fig. 3.7. Assim a aplicação do pulso aumentou a força mecânica no interior da região de ramificação do tê e também aprimorou o transporte convectivo do agente sanitizante no interior dessa zona de estagnação.

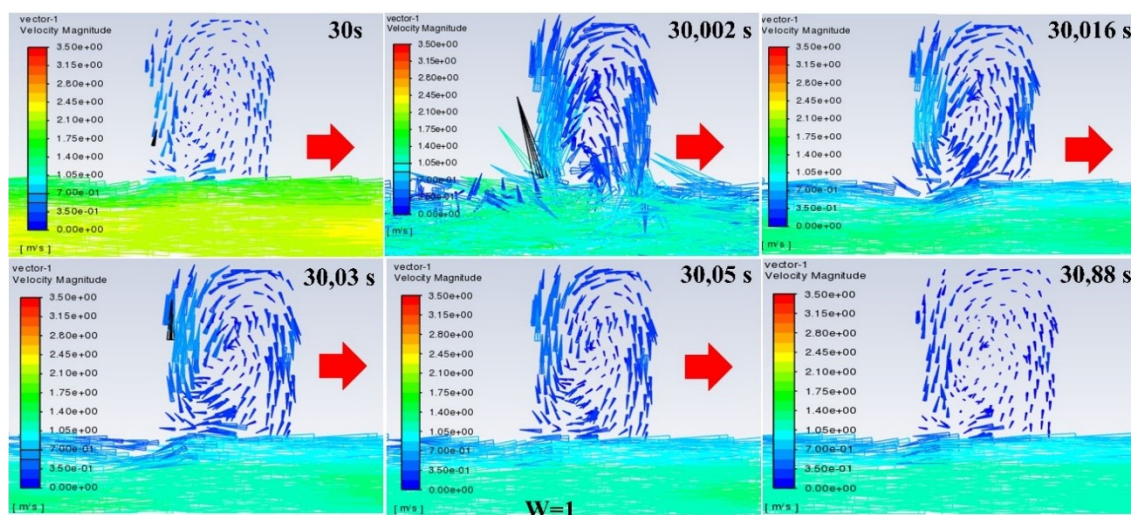


Figura 3.7 - Comportamento fluidodinâmico do sanitizante no interior da ramificação em tê durante a aplicação do pulso.

Nesse sentido, Bode et al. (2007) e Foste et al. (2013) mostraram que ondulação $W = 1$ foi capaz de aprimorar a limpeza e reduzir o tempo do processo. Relataram ainda que o aumento da ondulação entre um e dois não produziu significativa melhoria no desempenho da limpeza, assim como observado nas superfícies de respostas das Fig. 3.8A, 3.8D e 3.8E que não houve aumento na redução decimais de células de *Listeria innocua* em ondulações maiores que um.

Em relação ao período, observou-se que há um máximo devido ao termo quadrático negativo. Essa região ocorreu em torno do ponto central que corresponde a um período de 60 s o ciclo de pulsação. Yang et al. (2019) estudaram a limpeza de tanques de processamento de proteínas de ovo e constataram que o fluxo pulsado aprimorou a limpeza da superfície com 60 s. Períodos longos (>60 s) implicaram em menores quantidades de ocorrências do efeito anular, o que impactou na frequência da mudança do fluxo e na mudança do cisalhamento para quebrar adesão por meio de um mecanismo que envolve a fadiga da estrutura mecânica que os fixam na superfície, assim como propôs Guillham et al. (2000) na limpeza de incrustação de proteína do leite.

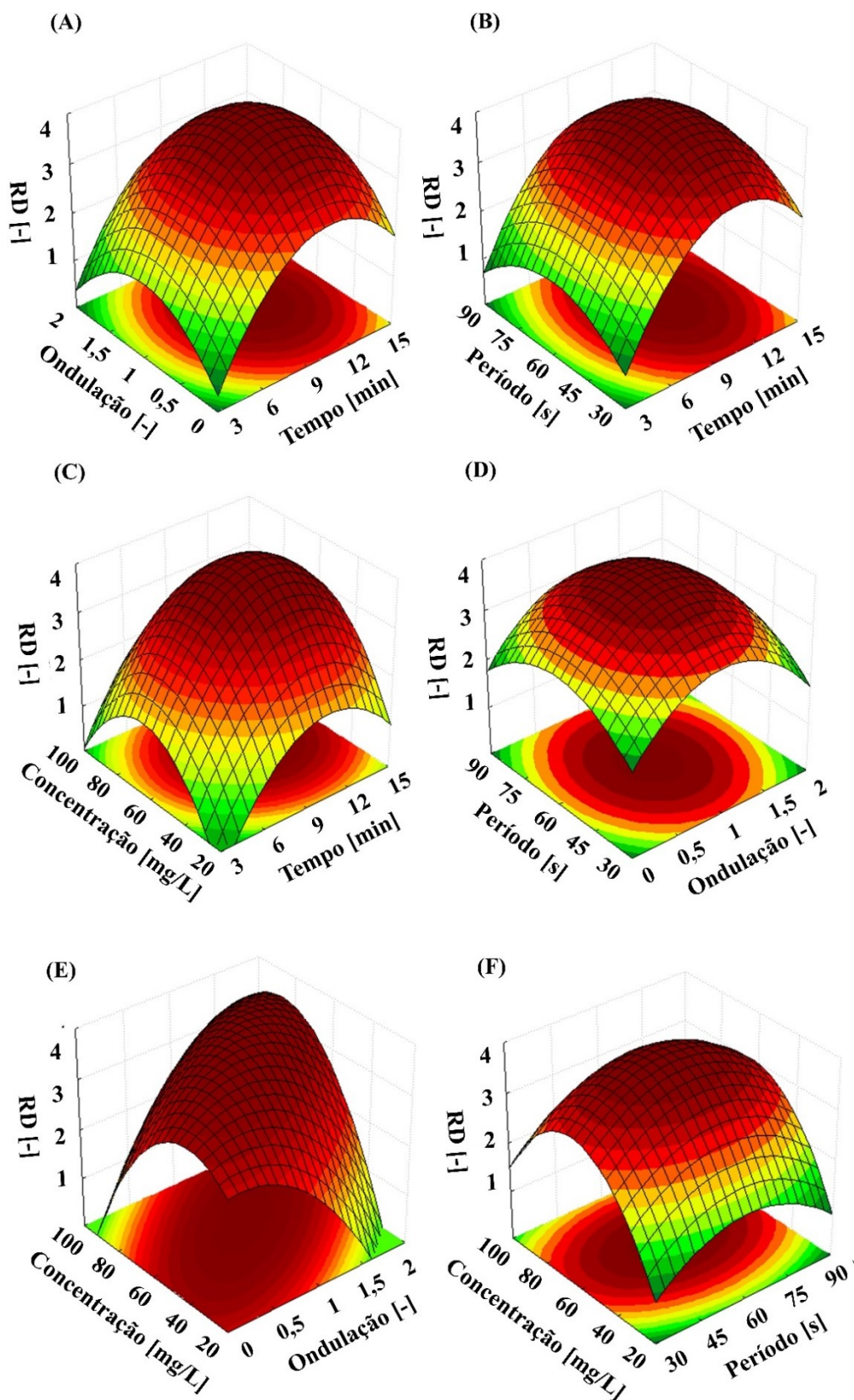


Figura 3.8 - Superfície Resposta para redução decimal na ramificação da tubulação em formato tê em função do tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.

O efeito do sanitizante foi significativo na redução decimal das células de *L. innocua*. O coeficiente linear positivo mostrou que o aumento da concentração de ácido peracético contribuiu para maiores reduções. Por outro lado, o coeficiente negativo associado ao termo quadrático indicou que existe um máximo em termos de concentração que efetivamente contribui para sanitização. Além disso, observou-se um efeito sinérgico positivo entre ondulação e a concentração do sanitizante. Conforme proposto por Fryer et al. (2011), as sujidades do tipo 2 e 3 ou seja, biofilmes, necessitam de produtos químicos para a remoção e o processo de higienização envolve o transporte do produto químico para o depósito, e alguma reação que o transforma em uma forma removível.

Nesse sentido, o transporte do produto químico pode ser convectivo e/ou difusivo. Além disso, após o transporte a atuação do agente químico depende da sua taxa de reação. O transporte puramente convectivo está associado ao movimento do fluido, ou seja, a sua velocidade. Ao passo que o transporte puramente difusivo está relacionado a diferença de concentração do agente químico. A ramificação da geometria tem apresenta-se como zona de estagnação com velocidades muito baixas e dessa forma o transporte do ácido peracético nesta região ocorre majoritariamente por difusão, o que justifica a baixa efetividade da sanitização, já que este processo é mais lento, comparado a convecção.

No entanto, quando se aplicou pulsos, observou-se a reversão do fluxo, formação de redemoinhos e conseqüentemente um significativo aumento da velocidade de escoamento no interior da zona de estagnação, o que contribui para melhoria do processo convectivo nessa região e transporte do agente sanitizante, o que justifica o efeito sinérgico apresentado na equação 12 da redução decimal e conseqüentemente causou aumento dos níveis de remoção/destruição das células.

3.3.3 Cotovelo

A análise da variância (ANOVA) para geometria cotovelo submetido a sanitização diferentes condições de fluxo pulsado são apresentados na Tabela 3.6. Todas as variáveis no processo de sanitização: tempo, ondulação, período do pulso e concentração do ácido peracético foram significativos na redução das células de *L. innocua* aderidas na superfície interior do cotovelo. O modelo predito para redução decimal com R^2 igual a 0,9827 é apresentado na Equação 3.13.

$$RD = 6,10 - 0,24 \cdot A^2 - 0,49 \cdot B^2 - 0,24 \cdot C^2 + 0,53 \cdot D - 0,46 \cdot D^2 + 0,85 \cdot A \cdot B - 0,36 \cdot A \cdot C + 0,21 \cdot A \cdot D + 0,73 \cdot B \cdot C + 0,36 \cdot B \cdot D + 0,50 \cdot C \cdot D \quad (3.13)$$

A redução decimal média observada no cotovelo foi 6,10. O tempo apresentou efeito sinérgico com a ondulação, com o período e com a concentração. Essa região ocorreu em torno do ponto central, onde a ondulação foi igual a um. Nessa configuração de pulso, o fluido sanitizante, no início de um ciclo do pulso, inicialmente apresentou um caminho preferencial próximo a curvatura interna da curva (Fig. 3.9). Em seguida, na alternância do escoamento causada pela aplicação do pulso, ocorreu o turbilhonamento do fluido no interior de toda a geometria, o que ofertou maiores velocidades a toda superfície interna, especialmente àquela região que inicialmente experimentava de menores velocidades. Por fim, o escoamento tende a estabilizar-se novamente com a formação de um caminho preferencial.

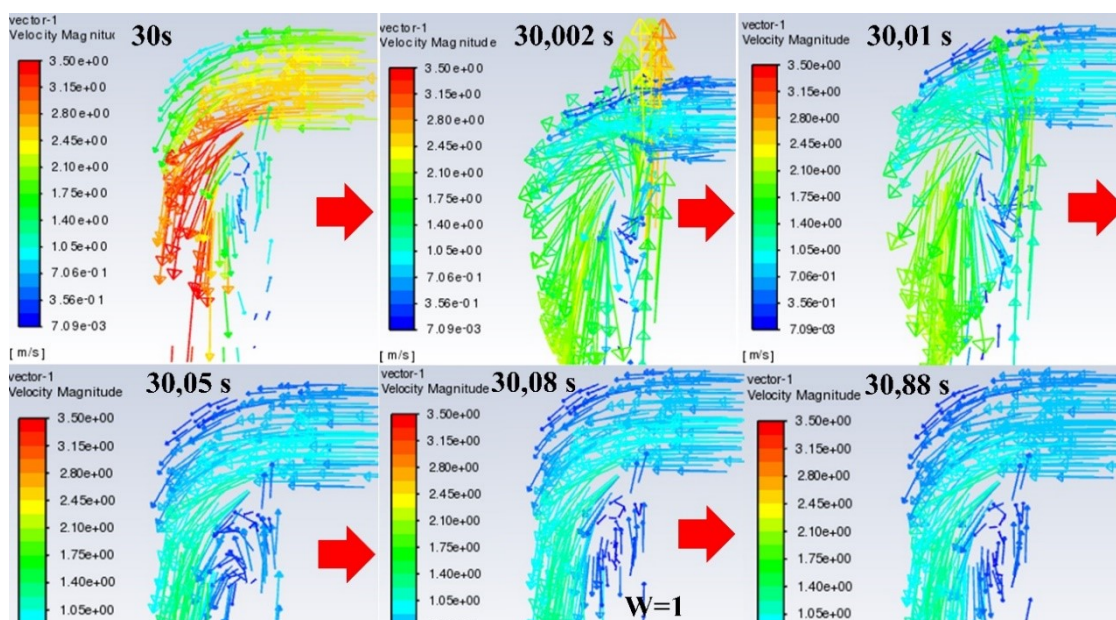


Figura 3.9 - Fluidodinâmica do agente sanitizante no interior do cotovelo durante a aplicação do pulso.

Nesse sentido, as maiores reduções foram observadas em maiores tempos e ondulações, conforme mostrado na superfície resposta apresentada na Fig. 3.10A. Já o binômio tempo e período produziram as maiores reduções com os tempos e períodos próximos ao ponto central, Fig. 3.10B. A combinação de tempo e concentração produziram as maiores reduções com maiores tempos de circulação sanitizante juntamente com soluções mais concentradas, Fig. 3.10C. Além disso, o termo quadrático associado ao tempo indicou um ponto de máximo em relação ao tempo.

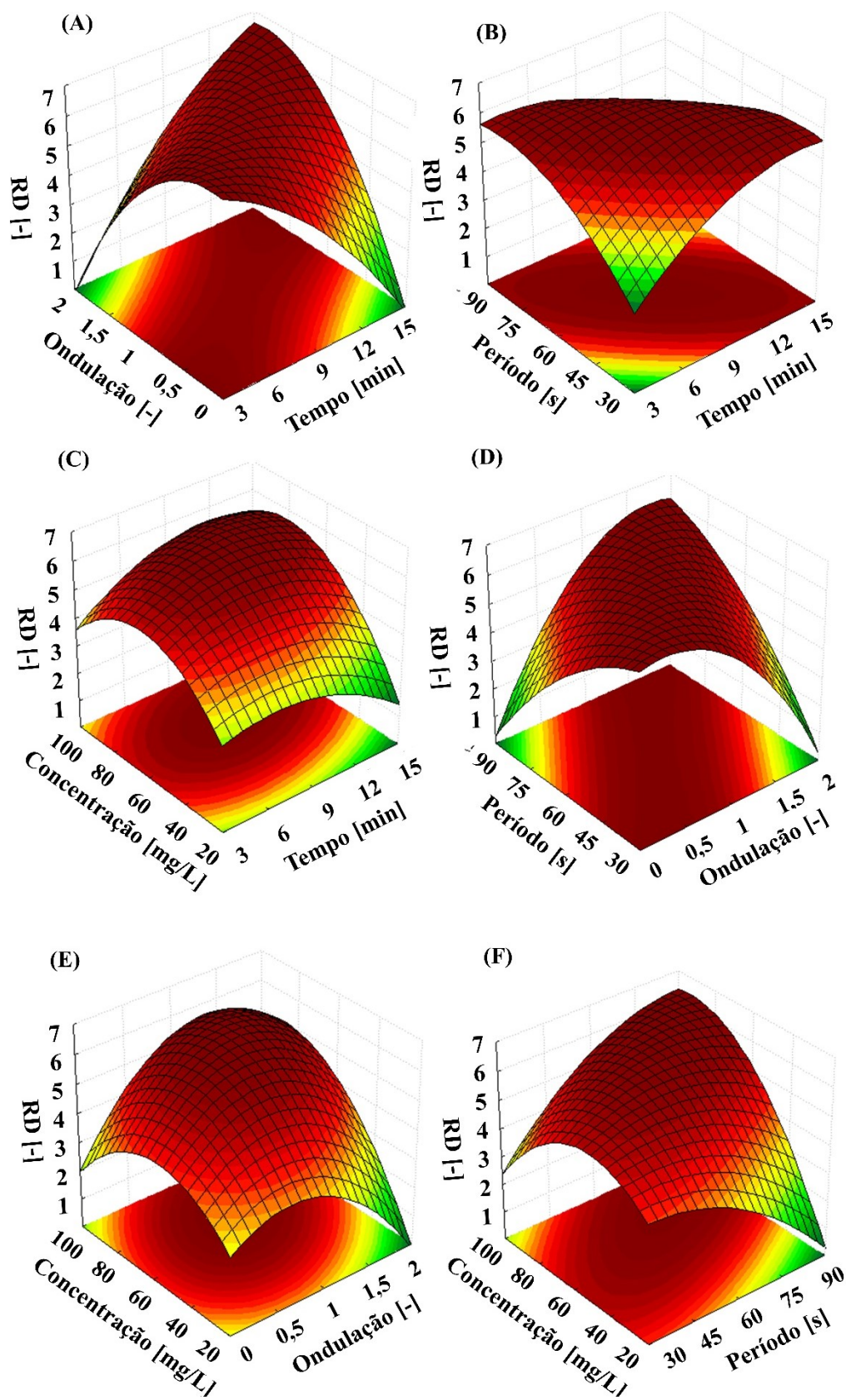


Figura 3.10 - Superfície Resposta para redução decimal na curva da tubulação em função do tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.

3.3.4 Expansão

O resultado do teste ANOVA para redução decimal observada na geometria de expansão gradual submetida a sanitização com fluxo pulsado é apresentado na Tabela 3.6. Todas as variáveis no processo de sanitização: tempo, ondulação, período do pulso e concentração do ácido peracético foram significativas na remoção e destruição das células de *L. innocua* aderidas à superfície de aço inoxidável. O modelo predito para redução decimal com R^2 igual a 0,974 é apresentado na Equação 3.14.

$$RD = 6,14 + 0,17 \cdot A - 0,16 \cdot A^2 + 0,05 \cdot B - 0,24 \cdot B^2 + 0,20 \cdot C - 0,04 \cdot C^2 - 0,07 \cdot D^2 + 0,17 \cdot B \cdot D + 0,11 \cdot C \cdot D \quad (3.14)$$

Com base na equação, observou-se redução decimal média de 6,14 na condição de fluxo pulsado no ponto central, com ondulação igual a 1, tempo de 9 min de circulação e período de 45 s associados à concentração de $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Esse comportamento ocorre já que a aplicação do pulso minimiza a estagnação do fluido na região de aumento do diâmetro da tubulação e aumenta a velocidade, tensão de cisalhamento e o grau de turbulência do fluido conforme mostrado na simulação fluidodinâmica do sanitizante mostrado na Fig. 3.11. Nesse sentido, Al Saabi et al. (2021) reiteraram que a flutuação na taxa de cisalhamento local contribui para remoção de células aderidas à tubulação de aço inoxidável.

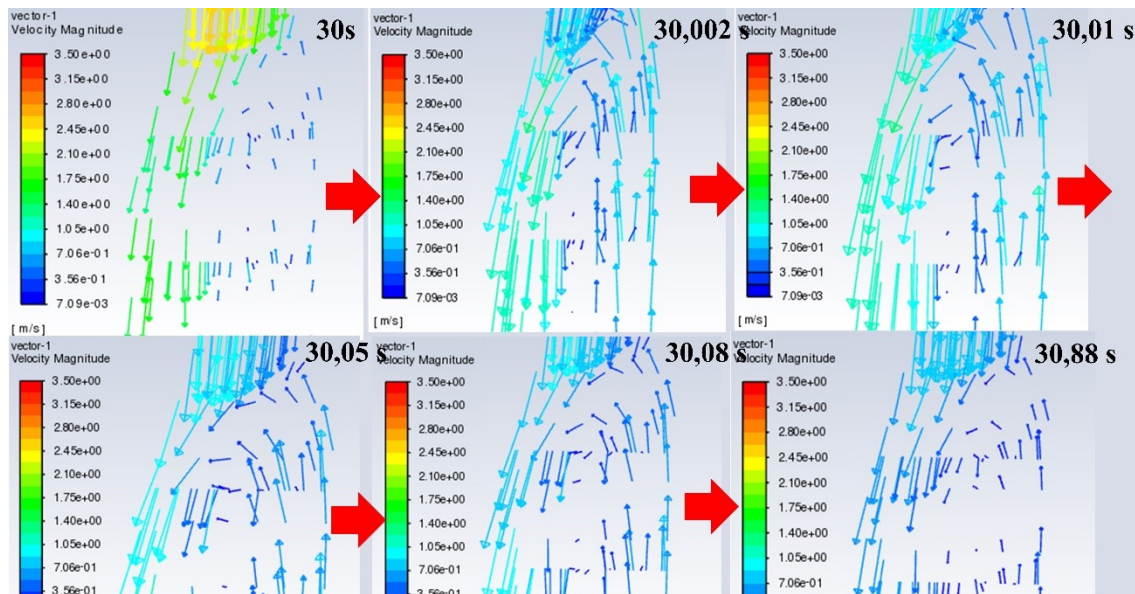


Figura 3.11 - Fluidodinâmica do fluxo pulsado no interior da expansão.

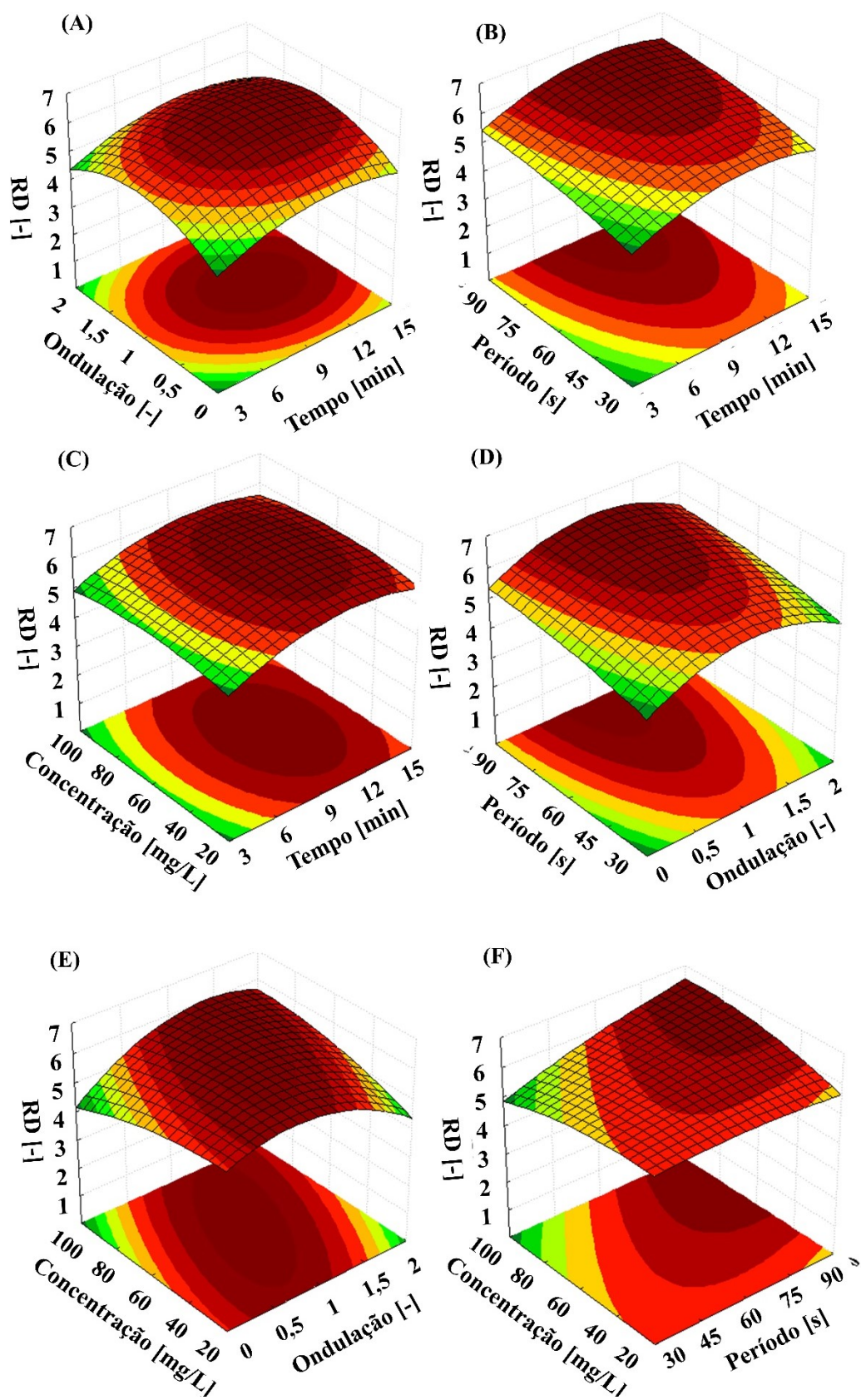


Figura 3.12 - Superfície Resposta para redução decimal na expansão de diâmetro da tubulação em função do tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.

A ondulação apresentou o menor coeficiente linear positivo, indicando uma pequena contribuição do aumento da magnitude da ondulação na remoção e destruição das células. Já o coeficiente negativo associado ao termo quadrático dessa variável mostrou que há um ponto de máximo nessa região investigada. Além disso, a redução decimal apresentou efeito sinérgico positivo em relação ao aumento da ondulação associado com maiores concentrações do agente sanitizante.

O tempo de circulação apresentou coeficiente linear positivo o que indicou que o aumento do tempo de contato do sanitizante com a superfície contaminada pode aumentar a redução decimal. O coeficiente negativa associado ao termo quadrático apontou que esse comportamento tem um ponto máximo em relação ao tempo de circulação da solução sanitizante. Esse comportamento é representado graficamente nas superfícies respostas mostradas na Fig. 3.12 A, Fig. 3.12 B e Fig. 3.12 C.

O período apresentou efeitos linear, quadráticos e sinérgicos com a concentração. Nesse sentido, o efeito linear apresentou a maior magnitude entre os coeficientes lineares, o que indicou que a maior duração do pulso foi mais favorável para promover maiores reduções no quantitativo de células. Isso ocorreu porque períodos com maior duração proporcionaram maior tempo da superfície sob condições de maior turbulência. Essa tendência pode ser observada nas superfícies resposta mostrada nas Fig 3.12B, Fig 3.12D e Fig 3.12E.

3.3.5 Redução

O resultado da ANOVA para redução gradual sob sanitização com fluxo pulsado é apresentado na Tabela 3.6. Todas as variáveis no processo de sanitização: tempo, ondulação, período do pulso e concentração do ácido peracético foram significativas na remoção e destruição das células de *L. innocua* aderidas à superfície de aço inoxidável. O modelo predito com R^2 igual a 0,9727 é apresentado na Equação 3.15.

$$RD = 6,02 + 0,23 \cdot A - 0,08 \cdot B^2 + 0,31 \cdot D - 0,27 \cdot D^2 + 0,15 \cdot A \cdot B - 0,10 \cdot A \cdot C + 0,31 \cdot A \cdot D + 0,37 \cdot B \cdot D + 0,15 \cdot C \cdot D \quad (3.15)$$

A redução decimal média de 6,02 no ponto central, com ondulação igual a 1, tempo de nove min de circulação e período de 45 s associados à concentração de 60 mg/L. O comportamento fluidodinâmico do sanitizante com aplicação do pulso pode ser observado na Fig. 3.13.

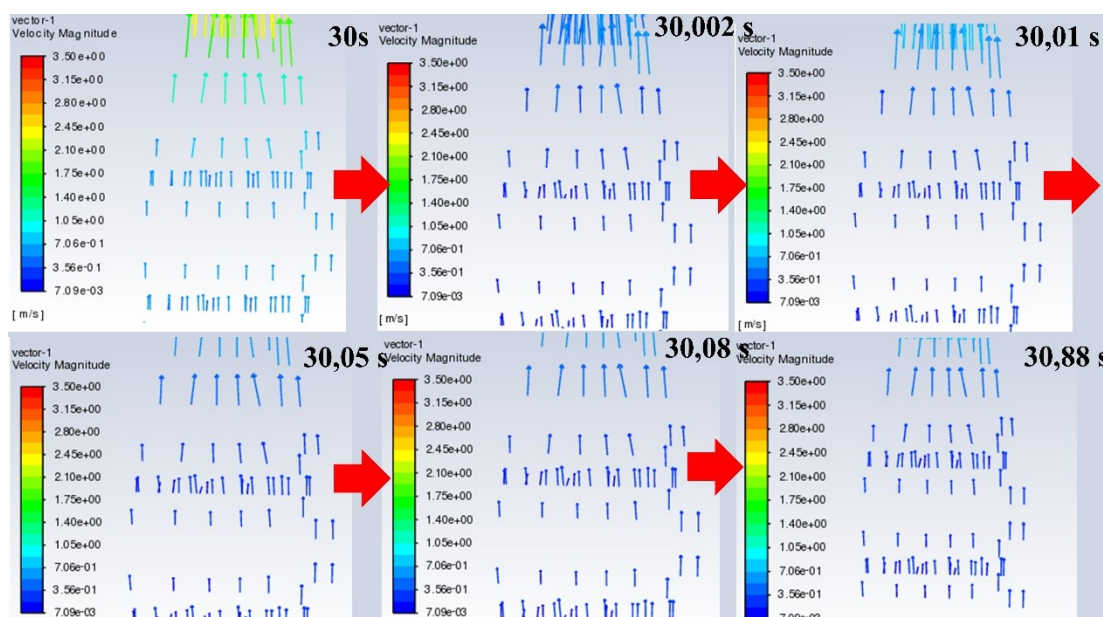


Figura 3.13 - Fluidodinâmica do fluxo pulsado no interior da redução de diâmetro.

Em relação ao tempo de circulação, o coeficiente linear positivo indicou que o aumento do tempo de contato do sanitizante em fluxo pulsado com a superfície contaminada pode aumentar a redução decimal. Além disso, o tempo apresentou efeito sinérgico com ondulação, período do pulso e concentração, de forma que os maiores tempos de circulação e concentração de agente químico aumentam a destruição e remoção de células na superfície, conforme mostrado nas Fig. 3.14 A, Fig. 3.14 B e Fig. 3.14 C.

A ondulação apresentou efeito quadrático negativo, o que indicou um máximo associado a redução decimal quando o processo é observado na região do ponto central em função desta variável. De forma sinérgica com a concentração, apresentou efeito cruzado positivo. Esse resultado mostrou que o aumento da ondulação associado ao aumento da concentração de ácido peracético pode maximizar a remoção e destruição de células aderidas, conforme mostrado na tendência da superfície resposta da Fig. 3.14 E.

Em relação à concentração do agente sanitizante, observou-se a contribuição deste efeito na forma linear, quadrática e com efeito cruzado com todas as demais variáveis: tempo, ondulação e período. Nesse sentido, o efeito linear de maior magnitude foi associado à concentração, indicando que o aumento da concentração de ácido peracético pode aumentar a redução decimal das células. Além disso, o aumento na magnitude das demais variáveis pode maximizar a destruição e remoção de células, conforme indicado pelos efeitos cruzados e mostrado nas superfícies respostas Fig. 3.14C, Fig. 3.14E e Fig. 3.14F.

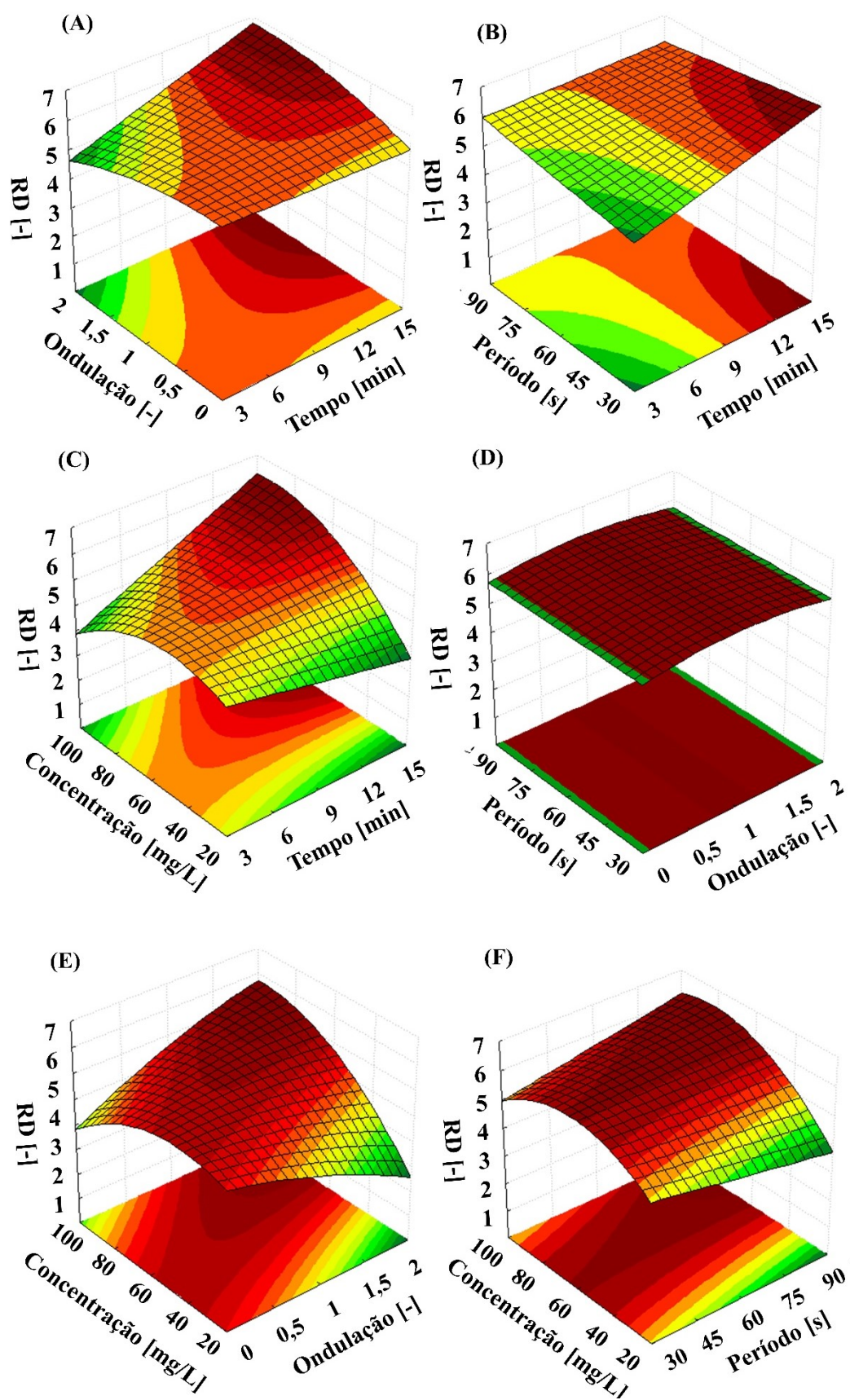


Figura 3.14 - Superfície Resposta para redução decimal na redução de diâmetro da tubulação em função do tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.

3.4 Consumo energético

A análise da variância ANOVA para o consumo energético com fluxo pulsado na sanitização é apresentado na Tabela 3.6. As variáveis tempo, ondulação e período do pulso foram significativas no consumo de energia. O modelo predito para o consumo com R^2 igual a 0,9836 é apresentado na Equação 3.16.

$$\delta = 124,62 + 37,28 \cdot A - 3,08 \cdot A^2 + 12,96 \cdot B - 4,85 \cdot B^2 - 4,57 \cdot C \quad (3.16)$$

O consumo médio na condição de pulso proposta no ponto central foi de aproximadamente 125 kJ. O tempo apresentou efeito linear e quadrático, sendo o efeito linear o mais expressivo no consumo, ou seja, o consumo de energia para circulação da solução sanitização é majoritariamente dependente do tempo de operação. Assim como o tempo, o aumento da ondulação impacta no aumento do consumo de energia, conforme indicado na superfície resposta da Fig. 3.15A, Fig. 3.15D e Fig. 3.15E.

Observou-se que as menores duração do pulso contribuiu para os maiores consumos de energia, devido ao coeficiente negativo na Equação 3.16. Esse comportamento é apresentado nas superfícies de resposta das Fig. 3.15 B, Fig. 3.15 D. O menor período implica em maior número de acelerações necessárias na bomba, fato que consome mais energia para romper a inércia e promover o pulso no volume de líquido bombeado, o que justifica o maior consumo energético. Por último, a concentração não apresentou efeito significativo no consumo energético, já que a solução sanitização é diluída e não alterada as propriedades do fluido como densidade e viscosidade.

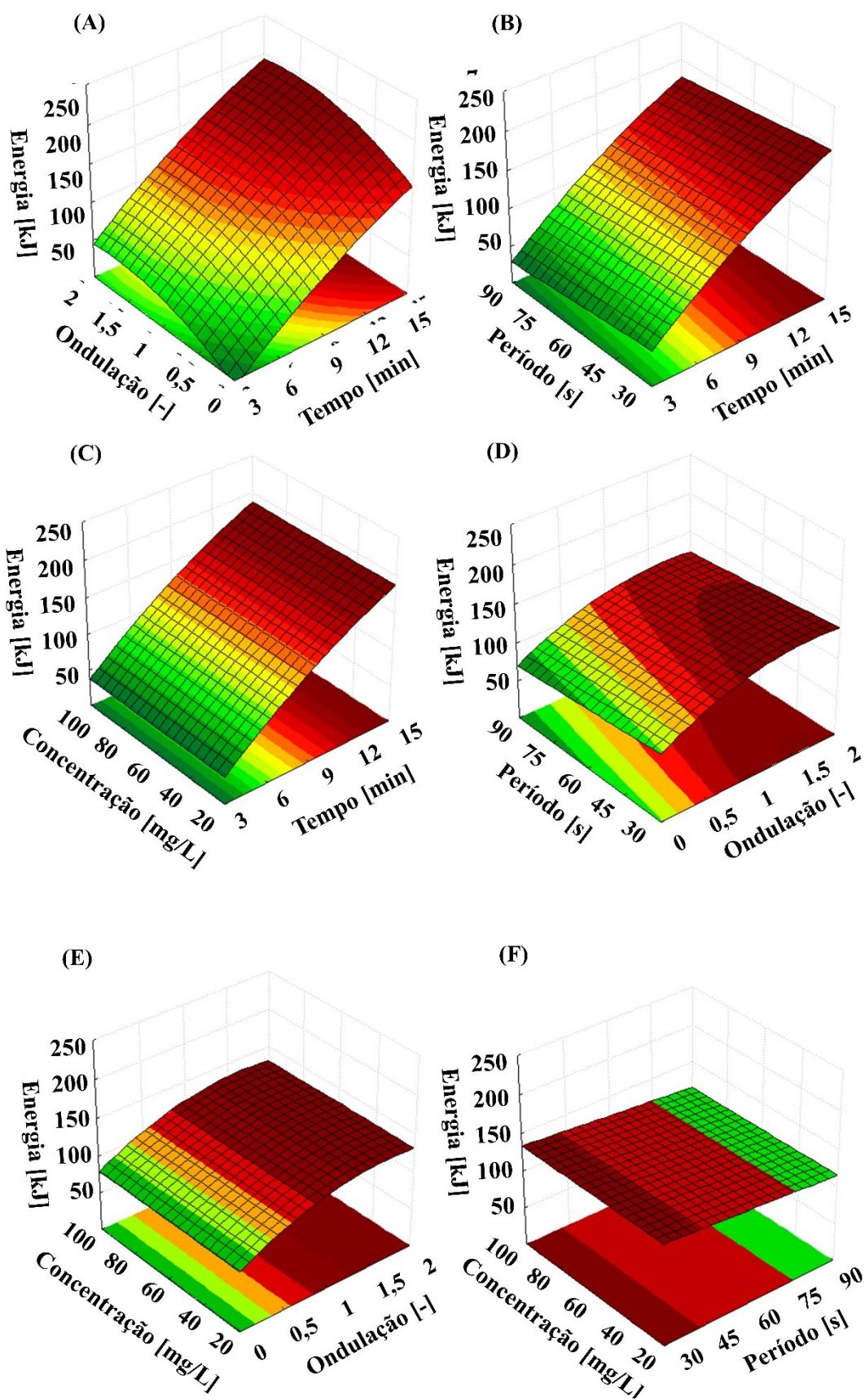


Figura 3.15 - Superfície Resposta do consumo de energia com fluxo pulsado em função do tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante.

3.5 Otimização

A otimização multivariável das respostas foi realizada por meio da função desejabilidade manipulando as variáveis significativas. As respostas em termos das reduções decimais das geometrias foram maximizadas, uma vez que se deseja a menor quantidade de células sésseis na superfície interna das geometrias após o processo de higienização para garantir a qualidade microbiológica do sistema de tubulação.

O ponto ótimo para sanitização foi estimado utilizando os modelos de regressão (Equações 3.11 a 3.15). A combinação ótima de tempo (A), ondulação (B), período (C) e concentração (D) em variáveis codificadas foram:

$$\begin{bmatrix} A \\ B \\ C \\ D \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -0,02 \\ 0,21 \\ -0,40 \\ 0,07 \end{bmatrix}$$

Em variáveis reais, essa combinação representa a seguinte condição:

$$\begin{bmatrix} \text{Tempo} \\ \text{Ondulação} \\ \text{Período} \\ \text{Concentração} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 8,9 \\ 1,1 \\ 66,0 \\ 61,4 \end{bmatrix}$$

Assim, essa combinação das variáveis, determinada pela otimização, produziu as seguintes reduções decimais médias nas geometrias, conforme apresentado na Tabela 3.7. Além disso, é apresentado o resultado esperado de redução decimal previsto para cada geometria de acordo com os modelos preditos. Na Tabela 3.7 é apresentada a comparação da eficácia do CIP otimizado com fluxo pulsado e o CIP tradicional, com fluxo constante.

Tabela 3.7 -Comparativo na redução decimal de células de *L. innocua* nas geometrias aplicando fluxo constante e a condição pulsada otimizada.

Geometria	Redução estimada	CIP otimizado	CIP Tradicional	<i>p</i>
TR	5,67	6,21 ± 0,06 ^{AC}	5,57 ± 0,29 ^a	0,0201
TÊ	3,83	4,54 ± 0,41 ^B	2,86 ± 0,20 ^c	0,0031
COT	6,00	5,03 ± 0,52 ^{AB}	4,51 ± 0,10 ^b	0,1642
EXP	6,05	6,45 ± 0,44 ^C	4,84 ± 0,44 ^{bd}	0,0110
RED	6,03	6,12 ± 0,56 ^{AC}	5,28 ± 0,26 ^{ad}	0,0780

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna ou por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferiram entre si. Os valores representam a média de três repetições.

Com base na redução decimal média das células apresentadas na Tab. 3.7, observou-se que a sanitização empregando fluxo pulsado, aprimorou os níveis de higiene do trecho cilíndrico reto, o tê e a expansão ($p < 0,05$), já apresentaram aumento na remoção e destruição de células com a combinação: tempo, ondulação, período e concentração, indicada pela otimização. A geometria cotovelo e a redução de diâmetro não apresentaram diferença estatística no processo tradicional em relação ao processo otimizado. Dessa forma, a sanitização com fluxo pulsado no ponto ótimo promoveu melhores níveis de higiene na tubulação, principalmente naquelas regiões, conhecidas pela formação de zonas de estagnação e recirculação de fluido. Esse resultado foi alcançado utilizando menor quantidade de sanitizante, aproximadamente 38,4% menos agente químico do que o processo tradicional.

Além disso, reduziu o tempo de operação em, aproximadamente, 6 min em comparação com o programa de higienização convencional, o que representa uma redução de 40% no tempo de parada para etapa de sanitização. Em termos de consumo energético, o processo tradicional consumiu em média 158,33 kJ de energia para circulação da solução sanitizante com fluxo estacionário, ao passo que com a condição ótima do fluxo pulsado foram consumidos aproximadamente 97,07 kJ. Essa redução no consumo de energia está associada principalmente ao menor tempo de funcionamento do equipamento e representa uma economia de 38,70% em comparação ao processo tradicional. Yang et al. (2019) e Silva et al. (2020) também mostraram que aplicação do fluxo pulsado na higienização CIP pode promover redução de tempo, energia ou insumos químicos.

4 CONCLUSÃO

A higienização das superfícies de tubulações e equipamentos no qual ocorrem o processamento de alimentos é um dos fatores chave para qualidade e segurança dos alimentos processados. Este trabalho avaliou comparativamente a sanitização na higienização CIP, usando fluxo constante e fluxo pulsado em cinco geometrias, usualmente encontradas nas instalações industriais lácteas e contaminadas com *Listeria innocua* e demonstrou que há melhoria significativa nos níveis de higiene nas geometrias ($p < 0,05$), especialmente naquelas que apresentam zonas de estagnação e recirculação de fluido, como a ramificação de tubulação em formato de tê.

Esse resultado foi explicado, principalmente, com base no comportamento fluidodinâmico do escoamento no interior das geometrias, de forma que os fenômenos de transferência: momento e massa de agente sanitizante foram aprimorados, quando aplicado o pulso em configuração ótima determinada pela técnica da desejabilidade. Dessa forma, o fluxo pulsado permitiu a redução do tempo de processo de sanitização e economia de insumos químicos e de energia, associado, ainda, a melhor qualidade microbiológica da superfície.

5 REFERÊNCIAS

- Absi, R., e Azouani, R. (2018). Toward automatic cleaning of industrial equipment: pulsed flow-induced wall shear stress. *Procedia CIRP*, 78, 359–363. <http://doi:10.1016/j.procir.2018.10.001>
- Al Saabi, A., Dallagi, H., Aloui, F., Faille, C., Rauwel, G., Wauquier, L., ... Bénézec, T. (2021). Removal of *Bacillus* spores from stainless steel pipes by flow foam: Effect of the foam quality and velocity. *Journal of Food Engineering*, 289, 110273. <http://doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110273>
- Aslam Bhutta, M. M., Hayat, N., Bashir, M. H., Khan, A. R., Ahmad, K. N., e Khan, S. (2012). CFD applications in various heat exchangers design: A review. *Applied Thermal Engineering*, 32, 1–12. <http://doi:10.1016/j.applthermaleng.2011.09.001>
- Asteriadou, K., Hasting, T., Bird, M., e Melrose, J. (2007). Predicting cleaning of equipment using computational fluid dynamics. *Journal of Food Process Engineering*, 30(1), 88–105. <http://doi:10.1111/j.1745-4530.2007.00103.x>
- Augustin, W., Fuchs, T., Föste, H., Schöler, M., Majschak, J.-P., e Scholl, S. (2010). Pulsed flow for enhanced cleaning in food processing. *Food and Bioprocess Processing*, 88(4), 384–391. <http://doi:10.1016/j.fbp.2010.08.007>
- Barbano, D. M., Ma, Y., e Santos, M. V. (2006). Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *Journal of Dairy Science*, 89, E15–E19. [http://doi:10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72360-8](http://doi:10.3168/jds.s0022-0302(06)72360-8)
- Barros, M. V., Salvador, R., Maciel, A. M., Ferreira, M. B., Paula, V. R. de, de Francisco, A. C., Rocha, C. H. B., e Piekarski, C. M. (2022). An analysis of Brazilian raw cow milk production systems and environmental product declarations of whole milk. *Journal of Cleaner Production*, 367, 133067. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133067>
- Bode, K., Hooper, R. J., Paterson, W. R., Ian Wilson, D., Augustin, W., e Scholl, S. (2007). Pulsed Flow Cleaning of Whey Protein Fouling Layers. *Heat Transfer Engineering*, 28(3), 202–209. <http://doi:10.1080/01457630601064611>

Blel, W., Le Gentil-Lelièvre, C., Bénézech, T., Legrand, J., e Legentilhomme, P. (2009). Application of turbulent pulsating flows to the bacterial removal during a cleaning in place procedure. Part 1: Experimental analysis of wall shear stress in a cylindrical pipe. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 422–432. <http://doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.07.008>

Blel, W., Legentilhomme, P., Legrand, J., Bénézech, T., e Gentil-Lelièvre, C. L. (2008). Hygienic design: Effect of hydrodynamics on the cleanability of a food processing line. *AIChE Journal*, 54(10), 2553–2566. <http://doi:10.1002/aic.11559>

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., e Whiting, R. C. (2018). Corrigendum to “A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments” [Food Control 75 (May 2017) 1–13]. *Food Control*, 88, 236. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2018.01.004>

Carpentier, B., e Cerf, O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8. <http://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>

Costa, A., Lourenco, A., Civera, T., e Brito, L. (2018). *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* strains from dairy plants behave similarly in biofilm sanitizer testing. *LWT*, 92, 477–483. <http://doi:10.1016/j.lwt.2018.02.073>

Derringer, G., e Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214–219. <http://doi:10.1080/00224065.1980.11980968>

Dufour, D., Leung, V., e Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2–16. <http://doi:10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>

Escrig, J., Woolley, E., Simeone, A., e Watson, N. J. (2020). Monitoring the cleaning of food fouling in pipes using ultrasonic measurements and machine learning. *Food Control*, 116, 107309. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2020.107309>

Fagerlund, A., Møretrø, T., Heir, E., Briandet, R., e Langsrud, S. (2017). Cleaning and Disinfection of Biofilms Composed of *Listeria monocytogenes* and Background Microbiota from Meat Processing Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17). <http://doi:10.1128/aem.01046-17>

Fernandes, S., Gomes, I. B., Simões, L. C., e Simões, M. (2021). Overview on the hydrodynamic conditions found in industrial systems and its impact in (bio)fouling formation. *Chemical Engineering Journal*, 418, 129348. <http://doi:10.1016/j.cej.2021.129348>

Föste, H., Schöler, M., Majschak, J.-P., Augustin, W., e Scholl, S. (2013). Modeling and Validation of the Mechanism of Pulsed Flow Cleaning. *Heat Transfer Engineering*, 34(8-9), 753–760. <http://doi:10.1080/01457632.2012.741499>

Fryer, P. J., Robbins, P. T., e Asteriadou, K. (2011). Current knowledge in hygienic design: can we minimize fouling and speed cleaning? *Procedia Food Science*, 1, 1753–1760. <http://doi:10.1016/j.profoo.2011.09.258>

Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., e Lombó, F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology*, 9. <http://doi:10.3389/fmicb.2018.00898>

Gottschalk, N., Reuter, L. S., Zindler, S., Föste, H., Augustin, W., e Scholl, S. (2019). Determination of cleaning mechanisms by measuring particle size distributions. *Food and Bioproducts Processing*, 113, 77–85. <http://doi:10.1016/j.fbp.2018.10.003>

Hall JE. Computational fluid dynamics: a tool for hygienic design. In: Wilson DI, Fryer PJ, Hasting APM, editors. *Fouling and cleaning in food processing*. Cambridge: Jesus College; 1998. p. 144e51.

Hammer, P., Bockelmann, W., e Hoffmann, W. (2017). Fate of *Listeria innocua* during production and ripening of smeared hard cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 7846–7856. <http://doi:10.3168/jds.2017-12823>

Inanoglu, S., Barbosa-Cánovas, G. V., Patel, J., Zhu, M.-J., Sablani, S. S., Liu, F., ... Tang, J. (2021). Impact of high-pressure and microwave-assisted thermal pasteurization on inactivation of *Listeria innocua* and quality attributes of green beans. *Journal of Food Engineering*, 288, 110162. <http://doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110162>

Kabir, M. N., Aras, S., George, J., Wadood, S., Chowdhury, S., e Fouladkhah, A. C. (2021). High-pressure and thermal-assisted pasteurization of habituated, wild-type, and pressure-stressed *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Staphylococcus aureus*. *LWT*, 137, 110445. <http://doi:10.1016/j.lwt.2020.110445>

Katsigiannis, A. S., Bayliss, D. L., e Walsh, J. L. (2021). Cold plasma decontamination of stainless steel food processing surfaces assessed using an industrial disinfection protocol. *Food Control*, 121, 107543. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2020.107543>

Koo, O. K., Ndahetuye, J. B., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C., e Crandall, P. G. (2014). Influence of *Listeria innocua* on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel and aluminum surfaces. *Food Control*, 39, 135–138. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2013.11.008>

Lelièvre, C., Legentilhomme, P., Gaucher, C., Legrand, J., Faille, C., e Bénézech, T. (2002). Cleaning in place: effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment. *Chemical Engineering Science*, 57(8), 1287–1297. [http://doi:10.1016/s0009-2509\(02\)00019-2](http://doi:10.1016/s0009-2509(02)00019-2)

Li, G., Hall, P., Miles, N., e Wu, T. (2015). Improving the efficiency of “Clean-In-Place” procedures using a four-lobed swirl pipe: A numerical investigation. *Computers e Fluids*, 108, 116–128. <http://doi:10.1016/j.compfluid.2014.11.032>

Li, G., Miles, N. J., Wu, T., e Hall, P. (2017). Large eddy simulation and Reynolds-averaged Navier–Stokes based modelling of geometrically induced swirl flows applied for the better understanding of Clean-In-Place procedures. *Food and Bioproducts Processing*, 104, 77–93. <http://doi:10.1016/j.fbp.2017.05.001>

Li, G., Tang, L., Zhang, X., e Dong, J. (2019). A review of factors affecting the efficiency of clean-in-place procedures in closed processing systems. *Energy*, 178, 57–71. <http://doi:10.1016/j.energy.2019.04.123>

Lopez, D., Vlamakis, H., e Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), a000398–a000398. <http://doi:10.1101/cshperspect.a000398>

Møretrø, T., e Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1(2), 107–121. <http://doi:10.1017/s1479050504001322>

Oliveira MMM, Brugnera DF, Piccoli RH. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2010; 69(3):277-84.

Ronner, A. B., e Wong, A. C. L. (1993). Biofilm Development and Sanitizer Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-n Rubber. *Journal of Food Protection*, 56(9), 750–758. <http://doi:10.4315/0362-028x-56.9.750>

Salim, M., Eason, T., e Boyd, B. J. (2022). Opportunities for milk and milk-related systems as ‘new’ low-cost excipient drug delivery materials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 183, 114139. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114139>

Schöler, M., Föste, H., Helbig, M., Gottwald, A., Friedrichs, J., Werner, C., ... Majschak, J.-P. (2012). Local analysis of cleaning mechanisms in CIP processes. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4), 858–866. <http://doi:10.1016/j.fbp.2012.06.005>

Silva-Angulo, A. B., Zanini, S. F., Rodrigo, D., Rosenthal, A., e Martinez, A. (2014). Growth kinetics of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* under exposure to carvacrol and the occurrence of sublethal damage. *Food Control*, 37, 336–342. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2013.09.050>

Silva, L., Souza, L. D., Santiago, T. A. S., e Rubens Gedraite. (2019). Control and tuning of pulsed flow for prototype CIP (clean in place). *Congresso Brasileiro de Instrumentação, Sistemas e Automação*. <http://doi:10.17648/cobisa-2019-101132>

Silva, L. D., Filho, U. C., Naves, E. A. A., e Gedraite, R. (2020). Pulsed flow in clean-in-place sanitization to improve hygiene and energy savings in dairy industry. *Journal of Food Process Engineering*, 44(1). <http://doi:10.1111/jfpe.13590>

Silva, L. D., Moreira, M. G., Guerra, N. T., Naves, E. A. A., Vianna, P. C. B., Coutinho Filho, U., e Gedraite, R. (2020). Clean in place (CIP) of different stainless steel geometries contaminated with *Pseudomonas fluorescens*. *Research, Society and Development*, 9(12), e23491210866. <http://doi:10.33448/rsd-v9i12.10866>

Sislian, R., da Silva, F. V., Coghi, M. A., e Gedraite, R. (2021). Neuro-fuzzy model-based simulation of a laboratory scale clean-in-place system: A study of the rinsing process. *Environmental Challenges*, 4, 100098. <http://doi:10.1016/j.envc.2021.100098>

Srey, S., Jahid, I. K., e Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.001>

Tetra Pak. Cleaning in Place: A Guide to Cleaning Technology in the Food Processing Industry: Handbook. Tetra Pack Processing Systems, 2015.

Toloi Torqueti, F., Lino Freitas, G., Carneiro Ferreira, D., Valetim Gelamo, R., Dias dos Anjos Gonçalves, L., e Anadrade Araújo Naves, E. (2019). Stainless steel surface functionalized with silver by cathodic sputtering. *Journal of Food Safety*, 39(5). <http://doi:10.1111/jfs.12668>

Oliveira, G. B. de, Favarin, L., Luchese, R. H., e McIntosh, D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 313–321. <http://doi:10.1590/s1517-838246220130963>

Oulahal, N., Brice, W., Martial, A., e Degraeve, P. (2008). Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control*, 19(2), 178–185. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2007.03.006>

Wang, L., Li, Y., Wang, L., Zhang, H., Zhu, M., Zhang, P., e Zhu, X. (2018). Extracellular polymeric substances affect the responses of multi-species biofilms in the presence of sulfamethizole. *Environmental Pollution*, 235, 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.060>

Wang, X., Demirci, A., Graves, R. E., e Puri, V. M. (2019). Conventional and Emerging Clean-in-Place Methods for the Milking Systems. *Raw Milk*, 91–115. <http://doi:10.1016/b978-0-12-810530-6.00005-5>

Wirtanen, G., Husmark, U., e Mattila-Sandholm, T. (1996). Microbial Evaluation of the Biotransfer Potential from Surfaces with *Bacillus* Biofilms after Rinsing and Cleaning Procedures in Closed Food-Processing Systems. *Journal of Food Protection*, 59(7), 727–733. <http://doi:10.4315/0362-028x-59.7.727>

Yang, J., Kjellberg, K., Jensen, B. B. B., Nordkvist, M., Gernaey, K. V., e Krühne, U. (2019). Investigation of the cleaning of egg yolk deposits from tank surfaces using continuous and pulsed flows. *Food and Bioproducts Processing*, 113, 154–167. <http://doi:10.1016/j.fbp.2018.10.007>

Zucaro, A., Santagata, R., e Ulgiati, S. (2022). Environmental assessment of milk production from local to regional scales. *Ecological Modelling*, 463, 109795. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2021.109795>

CAPÍTULO IV

MODELAGEM DA SANITIZAÇÃO *CLEAN IN PLACE* COM FLUXO PULSADO DE TUBULAÇÕES CONTAMINADAS COM *LISTERIA* *INNOCUA* USANDO REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

Resumo: A busca por modelos preditivos e pela otimização nas condições de operação do processo de higienização *clean in place* é fundamental para qualidade dos produtos e segurança microbiológica dos alimentos. As redes neurais artificiais (RNA) têm sido empregadas como uma alternativa satisfatória para a predição de sistemas de engenharia. Nesse sentido, o objetivo deste capítulo foi desenvolver um modelo baseado em RNA adequada para quantificar redução decimal de células de *Listeria innocua* na etapa de sanitização empregando fluxo pulsado. Além disso, comparar o desempenho da previsão pela técnica de superfície de resposta e regressão polinomial com o modelo determinado pela inteligência artificial e por último determinar o ponto ótimo de operação para o processo de sanitização com fluxo pulsado empregando a técnica de desejabilidade. Para isso foi empregado uma linha de circulação com as mesmas características daquelas encontradas nas indústrias de laticínios, sendo de aço inoxidável 304, polimento #4, com instrumentos de medida e controle do processo. Foram estudadas cinco geometrias diferentes: trecho cilíndrico reto, ramificação em T, curva na forma de cotovelo de 90°, acessórios de expansão e redução de diâmetro. As geometrias foram contaminadas com leite integral UHT, inoculado com *L. innocua* para possibilitar a adesão microbiana. Em seguida, as geometrias foram higienizadas com variadas configurações de fluxo pulsado, tempo e concentração de agente sanitizante. A amostragem foi realizada pela técnica de *swab* e o desempenho da higienização foi avaliado com base no número de reduções decimais no quantitativo de células. Essas reduções decimais foram utilizadas como dados experimentais de entrada e os múltiplos fatores: tempo de circulação de fluido, ondulação, período do pulso e concentração de agente sanitizante foram utilizados para desenvolver a rede neural e a redução decimal nas cinco geometrias distintas foram a resposta de saída. O modelo encontrado com uma camada oculta e trinta neurônios na camada oculta foi capaz de ajustar com precisão aos dados experimentais. Comparativamente, a modelagem por RNA foi mais precisa do que as predições indicadas por polinômios determinado pela técnica de superfície de resposta (RMS). Dessa forma, a condição ótima para sanitização da linha foi determinada em aproximadamente 9,7 min de circulação do agente sanitizante a 57 ppm, com ondulações de 1,12 e período de duração dos pulsos de 54 s e promoveu melhores níveis de higiene, com menor tempo de operação e economia de sanitizante.

Palavras-chave: Segurança microbiológica; Higienização; Inteligência Artificial.

Abstract: The search for predictive models and optimization of the operating conditions of the clean-in-place sanitation process is essential for product quality and microbiological food safety. Artificial neural networks (ANN) have been used as a satisfactory alternative for predicting engineering systems. In this sense, the objective of this work was to develop an adequate RNA-based model to quantify the decimal reduction of *Listeria innocua* cells in the sanitization step using pulsed flow. In addition, compare the prediction performance by the response surface technique and polynomial regression with the model determined by artificial intelligence and finally determine the optimal operating point for the sanitization process with pulsed flow using the desirability technique. For this, a circulation line was used with the same characteristics as those found in the dairy industries, being made of stainless steel 304, polishing #4, with instruments for measuring and controlling the process. Five different geometries were studied: straight cylindrical section, tee branching, 90° elbow curve, expansion accessories and diameter reduction. The geometries were contaminated with UHT whole milk, inoculated with *L. innocua* to allow microbial adhesion. Then, the geometries were sanitized with different configurations of pulsed flow, time and sanitizing agent concentration. Sampling was performed using the swab technique and cleaning performance was evaluated based on the number of decimal reductions in the number of cells. These decimal reductions were used as input experimental data and the multiple factors: fluid circulation time, ripple, pulse period and sanitizing agent concentration were used to develop the neural network and the decimal reduction in the five distinct geometries were the response of exit. The model found with a hidden layer and thirty neurons in the hidden layer was able to accurately fit the experimental data. Comparatively, the ANN modeling was more accurate than the predictions indicated by polynomials determined by the response surface technique (RMS). In this way, the optimal condition for sanitizing the line was determined in approximately 9.7 min of circulation of the sanitizing agent at 57 ppm, with undulations of 1.12 and a period of duration of the pulses of 54 s, and promoted better levels of hygiene, with less operating time and sanitizing savings.

Keywords: Food safety; Hygienization; neural networks.

1. INTRODUÇÃO

A higienização de equipamentos e superfícies de processamento de alimentos é fundamental para garantir a qualidade e segurança microbiológica do produto, em especial na produção de alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos. Nesse sentido, a tecnologia *clean in place* (CIP) é vantajosa, já que não requer a desmontagem de equipamento e evita o contato do operador com os produtos químicos (ESCRIG et al., 2020). As etapas envolvidas no processo CIP diário são: pré-enxágue com água, detergente alcalino para remover depósitos de gordura e proteína, enxágue com água para remoção do detergente alcalino e aplicação de sanitizante para remoção e destruição de microrganismos na superfície dos equipamentos (BREMER et al., 2006; DAVEY et al., 2013; SISLIAN et al., 2021).

Esse processo é necessário para evitar propagação de doenças de origem alimentar, a contaminação cruzada e a adesão e formação de biofilme no sistema industrial (TORQUETI et al., 2019). Além da higienização, o controle microbiológico depende da refrigeração adequada, manuseio, transporte e armazenamento para controlar a multiplicação de microrganismos no leite (REICHLER et al., 2020). No entanto, os microrganismos denominados psicrotróficos são capazes de se desenvolver e multiplicar em condições de refrigeração e isso os tornam especialmente responsáveis pela deterioração dos alimentos e compromete a segurança dos produtos no pós-processamento (HUA et al., 2021).

Listeria monocytogenes é uma espécie patogênica e psicrotrófica e apresenta alta resistência e consequentemente é capaz de sobreviver por longos períodos nos ambientes de processamento (HAMMER et al., 2017; KABIR et al., 2021). Essa espécie é responsável pela listeriose, que pode causar gastroenterite, infecções na corrente sanguínea e no sistema nervoso central ou provocar até aborto, dependendo das condições do organismo hospedeiro (CARPENTIER e CERF, 2011; BUCHANAN et al., 2017). *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* têm sido isoladas nos mesmos alimentos e ambientes de processamento (COSTA et al., 2018) e devido à similaridade genética e metabólica, *L. innocua* tem sido amplamente aplicada em estudos em plantas de processamento de alimentos (SILVA-ÂNGULO et al., 2014; INANOGLU et al., 2021).

Nesse sentido, embora os sistemas CIP sejam uma tecnologia usual na indústria, ainda apresentam lacunas e demandam melhorias, principalmente em relação a higienização de superfícies de processamento de matrizes alimentícias complexas, como leite, e em relação às regiões de difícil higienização, como zonas de recirculação e estagnação de fluido. Além disso, no que se refere à remoção de células de espécies resistentes nessas regiões (DELEPLACE et al., 2022; SILVA et al., 2023). Silva et al. (2020) discutiram a dificuldade da higienização nas zonas de estagnação e recirculação em geometrias *tê e cotovelo* e o impacto desse *layout* na higienização.

Nessa perspectiva, a complexidade do processo CIP está relacionada à sujidade a ser removida, aos agentes químicos empregados, o tempo de contato, a temperatura de aplicação, à geometria do sistema e às condições fluidodinâmicas do escoamento (SISLIAN et al., 2021). Os processos CIP são normalmente realizados com fluxo constante e envolvem a busca de estratégias para aumentar velocidade no local e o cisalhamento do fluido sobre as interfaces dos equipamentos e tubulações, em especial nas regiões com estagnação e recirculação de fluido (LI et al., 2015).

De acordo com Silva et al. (2023), uma estratégia promissora para aprimorar essas condições fluidodinâmicas é a aplicação de pulsos, pois melhora os fenômenos de transporte naquelas regiões de difícil higienização e não exige a aquisição de novos equipamentos e instalações. A execução do fluxo pulsado necessita apenas da adequação na lógica de controle do sistema de vazão na planta (SILVA et al., 2020). Além disso, aprimorar o processo CIP é necessário, já que o tempo de inatividade representa a redução na produção. Em termos ambientais gera efluentes residuais devido aos produtos químicos e aos enxágues. Por fim, sob o ponto de vista energético, a higienização representa 13%, em média, da energia gasta na indústria de laticínios (LI et al., 2019).

Para otimizar as condições desse processo de higienização, métodos matemáticos baseados em dados computacionais ou resultados experimentais são associados às ferramentas de inteligência artificial, como redes neurais. Essas formas são úteis para prever o comportamento do sistema, assim como em outras aplicações de engenharia (SH et al., 2017; WADAY et al., 2022). Assim, uma modelagem baseada em resultados experimentais fornece um método fácil e pouco dispendioso, além de agilizar a previsão e otimização dos resultados (VISWANATHAN et al., 2022).

O arranjo de uma rede neural artificial (RNA) consiste em diferentes seções interconectadas, que pode ser formada por uma única camada ou por estruturas de múltiplas camadas (ZHANG e YANG, 2003). Na RNA, os dados de entrada são alimentados aos neurônios de entrada (sinapses) e são ponderadas por pesos que, por sua vez, são ajustados ao longo do processo de aprendizagem (PORTILLO JUAN e NEGRO VALDECANTOS, 2022). A soma ponderada é aplicada em uma função de ativação, e assim a saída de dados é gerada. Todos os neurônios estão altamente conectados e de forma iterativa ocorre o treinamento da rede de neurônios, a fim de obter o modelo ideal, com a interpolação de padrões de treinamento, a fim de obter a precisão (BELLO e OLAFADHAN, 2021). Um modelo simplificado de uma RNA é ilustrado na Figura 4.1.

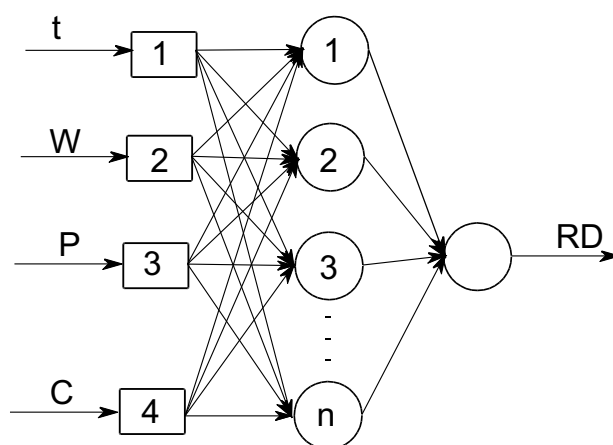


Figura 4. 1 - - Representação esquemática da rede neural *perceptron* em multicamadas para predição da redução decimal (*RD*) em função das entradas (*t*) tempo, (*W*) ondulação, (*P*) período e (*C*) concentração

Outra abordagem usual empregando dados experimentais são os modelos estatísticos. No entanto, eles apresentam limitações em discernir a não linearidade (GAGO et al., 2010). Já as técnicas de aprendizado de máquina não linear e não paramétrico são eficientes em lidar com grandes quantidades de dados não determinísticos com múltiplas entradas e múltiplas saídas. As redes neurais artificiais (RNAs) têm se mostrado uma ferramenta capaz de modelar problemas multivariados não lineares complexos (VISWANATHAN et al., 2022).

Nesse contexto, o objetivo deste capítulo foi desenvolver um modelo baseado em RNA para descrever a redução decimal de células de *L. innocua* no processo de sanitização com fluxo pulsado. Além disso, avaliar a eficiência o modelo RNA comparativamente ao modelo estatístico desenvolvido pela técnica de superfície de

resposta (RMS) por meio de parâmetros de acurácia e por fim determinar a condição ótima de operação do processo de higienização CIP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

Os estudos foram conduzidos utilizando suspensão bacteriana de *L. innocua* (ATCC 33090). Essa cultura estava liofilizada e a ativação foi realizada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Merck, São Paulo, Brasil), três vezes consecutivas e incubadas em estufa tipo BOD (TECNAL), por 24 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Após três ativações, uma alíquota foi transferida para o leite integral UHT (Bonalat) de forma a produzir uma suspensão a 1% de inóculo, a qual era inserida no interior das geometrias para promover o processo de adesão. O número de microrganismos foi determinado por contagem total em placas utilizando ágar padrão para contagem (PCA, Kasvi, Itália) e o número de unidade formadoras de colônias inicial por mL foi de aproximadamente 10^8 UFC.mL^{-1} .

2.2. Adesão microbiana

Antes do processo de higienização CIP das superfícies em estudo, todas as geometrias foram previamente limpas com água potável e detergente líquido neutro e autoclavadas a 121°C por 30 min. Posteriormente, as geometrias foram preenchidas com leite integral contendo a suspensão bacteriana, foram incubadas durante 12 h a 37°C , de acordo com a cinética de adesão determinada previamente. A incubação estática foi escolhida para garantir a homogeneidade da adesão na superfície e isolar os efeitos hidrodinâmicos conforme sugerido por Lelièvre et al. (2002) e Silva et al. (2020).

Após a incubação, o leite foi drenado e as geometrias foram instaladas na linha de circulação para serem submetidas ao processo CIP. Uma réplica da geometria utilizada na higienização foi selecionada para a contagem inicial de células na superfície. Essa geometria foi preenchida com água peptonada (Acumedia, Lansing, Estados Unidos) 0,1% (m/v), a qual permaneceu no interior da superfície, por 1 min, e em seguida descartada, para remoção das células planctônicas.

As células sêsseis foram removidas com auxílio de um *swab* e transferidas para uma solução de água peptonada 0,1% (m/v) onde permaneceu por 2 min em agitação em vórtex (Velp, Wizard Advanced IR) para a liberação das células para a solução. Após essa etapa, diluições seriadas foram preparadas e plaqueadas, pelo método *pour plate*, em ágar padrão para contagem (PCA – Kasvi, Itália). As placas foram incubadas por 24 h à 37°C. O resultado da contagem foi expresso em UFC.cm⁻², empregado a Equação 4.1:

$$Contagem[UFC \cdot cm^{-2}] = \frac{NV_R}{V_D A} \quad (4.1)$$

em que *C*: contagem média do número de colônias [UFC]; *V_R*: Volume usado na *rinsagem* [mL]; *V_A*: Volume usado no plaqueamento [mL]; *A*: área da geometria [cm²].

2.3.Unidade experimental

O sistema utilizado neste estudo foi descrito por Silva et al. (2020). Uma tubulação com estrutura e características similares às usadas em unidades de processamento de laticínios foi usada, sendo em aço inoxidável AISI 304, grau de polimento #4. O protótipo da linha de circulação é apresentado na Fig 4.2.

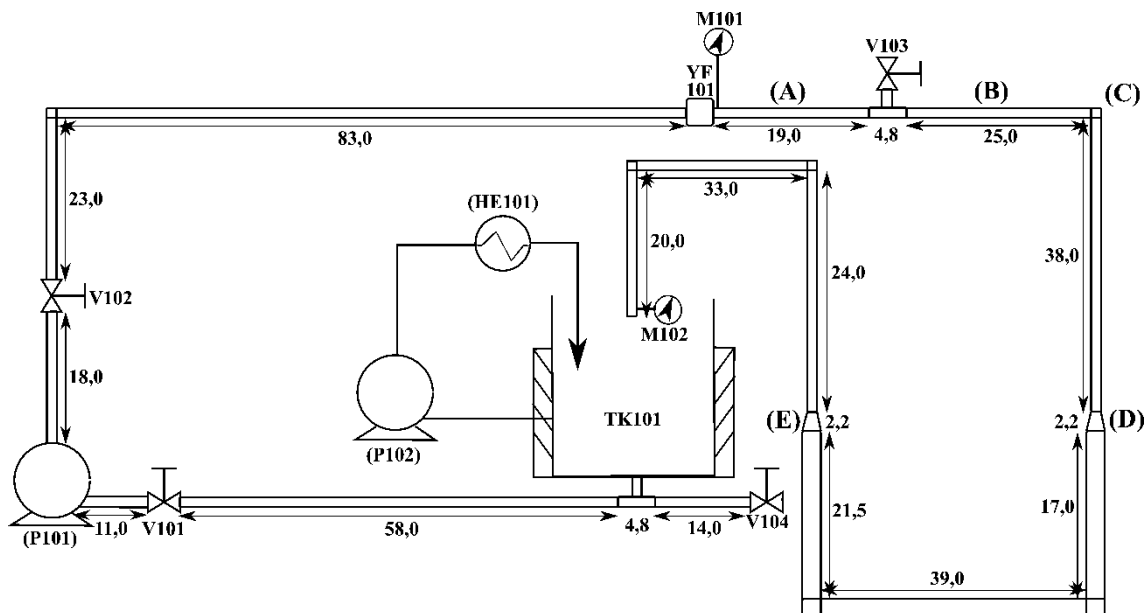


Figura 4. 2 - Representação esquemática da linha de circulação.

Legenda: TK – tanque de armazenamento de leite e soluções de limpeza (capacidade de 25 L); V – válvulas de bloqueio tipo esfera com conexão roscada de ½”; P – bomba centrífuga para promover a circulação de fluidos e agentes de limpeza no sistema; YF - sensor de vazão da turbina ½", M - manômetro de tubo em U, HE - trocador de calor, superfícies de diferentes geometrias: seção cilíndrica reta (A), tê (B), cotovelo (C), expansão (D) e redução (E).

A linha era composta por seções com extremidades rosqueáveis, que permitem a desmontagem e amostragem da superfície das geometrias em investigação. As seções de teste estudadas foram: trecho cilíndrico reto (A), tê (B), cotovelo (C), expansão ½” para 1” (D) e redução 1” para ½” (E) usualmente encontrados nas linhas de circulação e apresentam diferentes intensidades de cisalhamento. O sistema de controle da vazão utilizou controlador PID e configurado no ambiente Arduino conforme descrito por Silva et al. (2019).

2.4.Higienização

Após as geometrias serem submetidas à contaminação, elas foram instaladas na linha de circulação para a execução da higienização CIP, tradicionalmente executada, diariamente, na indústria de laticínios e que compreende as seguintes etapas: pré-enxágue, detergente alcalino, enxágue, sanitização e enxágue final.

Primeiramente, preencheu-se o tanque de armazenamento (TK 101) com água potável da rede de distribuição a temperatura ambiente para o pré-enxágue. Iniciou-se a circulação da água em circuito aberto por 5 min para remoção de resíduos de leite. Todas as etapas do procedimento foram executadas com velocidade média de $1,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ conforme o usual e recomendado pela literatura (TAMINE, 2008; ANDRADE 2008) para higienização de tubulações, produzindo assim número de Reynolds igual a 23700.

Ao final do pré-enxágue, deu-se início a limpeza alcalina com a circulação do detergente NaOH a 1% (m/v) em circuito fechado durante 15 min conforme sugerido por Andrade (2008) e a temperatura de 70°C conforme indicado pela Tetra Park (2015) para procedimento CIP de tubulações. O enxágue do detergente alcalino foi realizado com água potável em circuito aberto para remoção do NaOH residual. O enxágue foi finalizado quando a condutividade do efluente da tubulação era equivalente à condutividade da água de alimentação no valor de $200 \pm 12 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

A sanitização foi realizada com ácido peracético a temperatura ambiente, conforme preconizado por Andrade (2008) e Costa et al., (2017) com tempo e concentração de agente sanitizante variável em circuito fechado de circulação do sanitizante. Por fim, realizou o enxágue com água potável em circuito aberto durante 5 min para remoção do sanitizante residual. Os pulsos foram produzidos na etapa de sanitização pela variação da vazão proporcionada pela bomba centrífuga (P 101), a qual estava acoplada a um inversor

de frequência (SY 101) (Figura 4.2). A sintonia do controlador para geração dos pulsos foi descrita por Silva et al. (2019). As condições foram inseridas no console do controlador de acordo com cada configuração proposta.

A eficácia do processo foi determinada de acordo com proposto por Sharma e Anand (2002) e utilizado por Kumari e Sakar (2014) e Silva et al. (2020). A quantificação de células sobreviventes após o processo CIP foi determinada pela técnica *swab*, com diluições seriadas em água peptonada (Acumedia, Michigan) e plaqueamento com PCA. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h, e as colônias foram contadas e expressas como log UFC.cm⁻². A Redução Decimal (RD) de células aderidas nas geometrias foi calculado com base na Equação 4.2.

$$RD = \log N - \log n \quad (4.2)$$

em que N representa a contagem inicial de células na superfície (UFC.cm⁻²) e n a contagem de (UFC.cm⁻²) após o processo CIP.

2.5.Delineamento experimental

As configurações e resultados experimentais do Capítulo 3 foram utilizadas para desenvolvimento da RNA, considerando a influência das quatro variáveis de entrada (tempo, ondulação, período e concentração de sanitizante) na resposta de saída, a redução decimal de células de *L. innocua* na sanitização com fluxo pulsado. Os 19 experimentos projetados no planejamento composto central (PCC) do Capítulo 3 foram utilizados, assim como outros 5 experimentos adicionais em condições aleatórias foram realizados para viabilizar o quantitativo de pontos para treino e teste da rede neural. Além disso, as equações 3.11 a 3.15 determinadas pela técnica de superfície de resposta (RMS) para as cinco geometrias no Capítulo 3 foram empregadas neste estudo para fins de comparação na capacidade preditiva de cada técnica de modelagem.

2.6.Modelagem e rede neural artificial (RNA)

Neste trabalho, a rede neural *perceptron* multicamada (MLP) com a *backward propagation* (BP) foi selecionada para modelagem dos dados experimentais por ser

eficiente na representação de sistemas multivariados não lineares. Nesta rede, a camada de entrada recebe as diferentes condições de fluxo pulsado: tempo de circulação (t), ondulação (W), período do pulso (P) e concentração do agente sanitizante (C). A camada de saída prediz a redução decimal (RD) de células de *L. innocua* em cada uma das cinco geometrias estudadas. A função de ativação para os neurônios da rede MLP pode ser linear ou não linear com funções como logarítmica, linear, tangente hiperbólica, sigmoideal, entre outras. Para este trabalho, a tangente hiperbólica (Equação 4.3) foi utilizada, pois há relatos que essa função é a mais utilizada em uma configuração MPL.

$$f(x) = \frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}} \quad (4.3)$$

A Equação 4.3 pode ser manipulada algebricamente e apresentada conforme mostrado na Equação 4.4.

$$f(x) = \frac{2}{1 + e^{-2x}} - 1 \quad (4.4)$$

em que x é a soma de todos os neurônios de entrada e $f(x)$ apresenta o intervalo de -1 a 1.

Em relação ao número de camadas ocultas, deve-se analisar que o aumento do número de camadas ocultas causa aumento do custo computacional e, às vezes, o ajuste excessivo, pode reduzir o desempenho RNA. Dessa forma, na prática, as RNAs, podem apresentar uma ou duas camadas ocultas. Nesse arranjo, elas apresentam bom desempenho de predição. Portanto, a arquitetura de uma camada oculta foi implementada.

Para fixar o número ótimo de neurônios ocultos, diferentes fórmulas e metodologias são propostas. No entanto, o número ideal de neurônios ocultos depende principalmente dos erros de saída da RNA (NAJAFI et al., 2018). Para avaliar a eficiência de desempenho da RNA, diferentes definições de erro e precisão são propostas (CHOI et al., 2008; SHARMA et al., 2020), tais como Erros Quadrados Médios (MSE) e coeficiente de correlação (R), conforme mostrado nas Equação 4.5 e Equação 4.6.

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - y_{des})^2}{N} \quad (4.5)$$

$$R = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - y_{des})}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{des})} \quad (4.6)$$

sendo N é o número de dados, y_{des} dados de referência (ou seja, valores desejados), y_i resultados observados (ou seja, valores reais) e $\bar{y}_{des}$ média dos valores desejados. O banco de dados para RNAs foi fornecido por 24 experimentos. Os valores limitados das variáveis de entrada-saída consideradas estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4. 1 - Variáveis de entrada e saída na rede neural e respectivas faixas de valores.

	Faixa de valores	Unidades
Variáveis de entrada		
Tempo (t)	0-15 min	min
Ondulação (W)	0-2	-
Período (P)	30-90	s
Concentração (C)	20-100	mg·L ⁻¹
Variáveis de saída		
Redução decimal (RD)	0-6	-

As entradas-saídas dos dados experimentais foram classificadas aleatoriamente em grupos de treino e teste. Neste estudo, 80% dos dados experimentais são utilizados como dados de treinamento e 20% das entradas-saídas como dados de teste. Devido à magnitude diferente das variáveis de entrada-saída, o banco de dados no intervalo de [-1 a 1] é normalizado conforme mostra na Equação 4.7.

$$\phi_n = \frac{\phi - \left(\frac{\max(\phi) + \min(\phi)}{2} \right)}{\min(\phi)} \quad (4.7)$$

em que ϕ_n é a entrada normalizada.

A modelagem dos resultados experimentais usando redes neurais artificiais foi implementado na plataforma *Colab*. A Fig. 4.3 mostra o algoritmo da RNA usado para determinação do modelo, com a normalização, participação dos dados em treino e teste, a rotina de aprendizagem da rede neural e os parâmetros de acurácia.

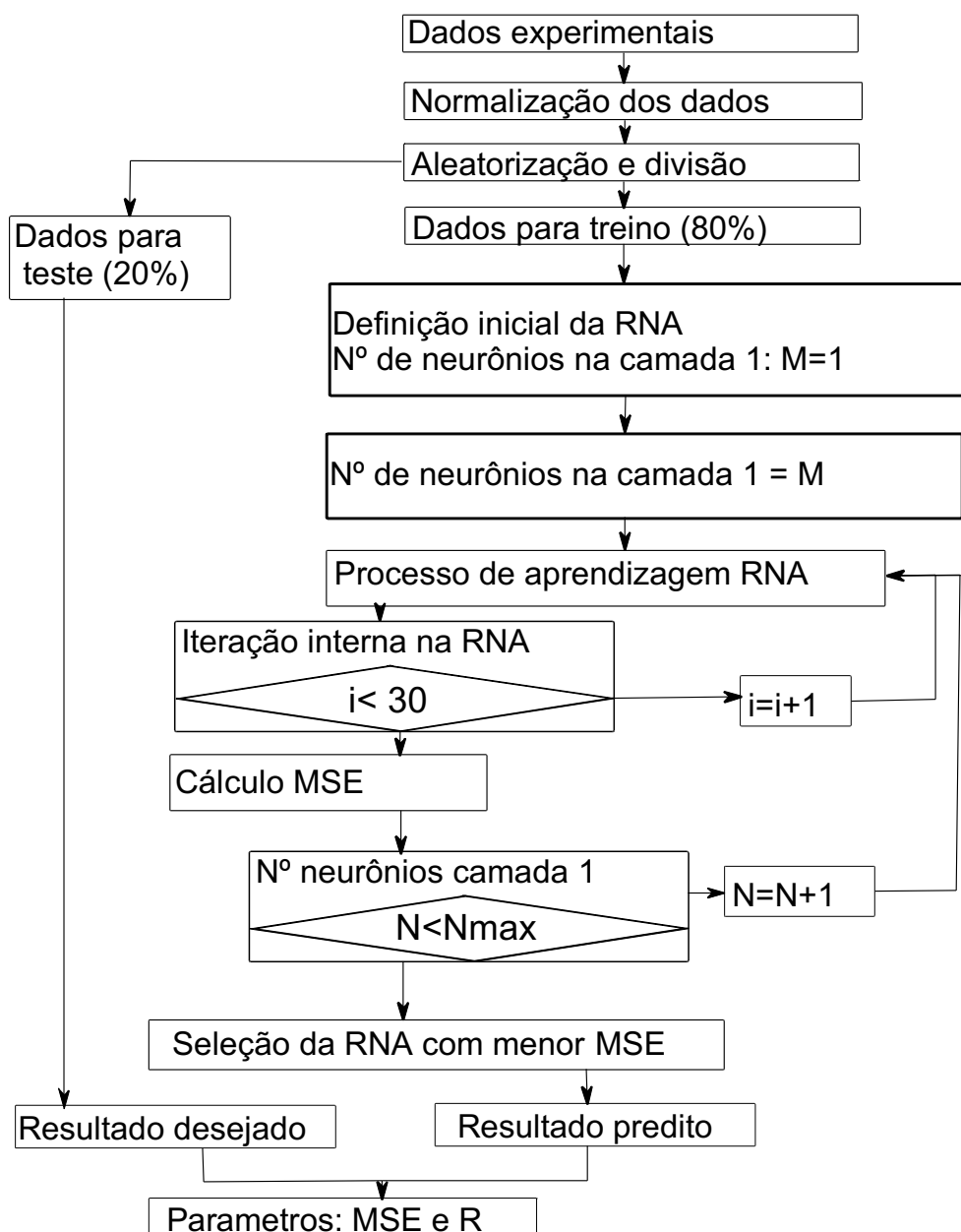


Figura 4. 3 - Algoritmo para desenvolvimento da arquitetura apropriada de RNAs.

2.7.Otimização

As condições ideais globais para otimizar o processo de sanitização pulsada foram determinadas pela técnica da desejabilidade para a otimização da redução de células de *L. innocua* com algoritmo de Evolução Diferencial. A desejabilidade d_i representa a resposta individual para cada geometria e varia de 0 a 1, onde 0 representa uma resposta completamente indesejável e $d_i = 1$ representa a resposta ideal. As desejabilidades individuais d_i são então combinadas usando média geométrica, em uma única desejabilidade global D , que é otimizada para encontre o conjunto ideal de condições que

proporcione as maiores remoções de células, conforme indicado de forma genérica pela Equação 4.8.

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots d_n)^{\frac{1}{n}} \quad (4.8)$$

com n denotando o número de respostas.

A função desejabilidade assume formatos específicos de acordo com interesse de maximização ou minimização. A desejabilidade individual da resposta a ser maximizada é definida como mostrado na Equação 4.9.

$$d_i = \begin{cases} 0 & \text{se, } Y_i < L_i \\ \left[\frac{Y_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^s & \text{se, } L_i < Y_i < T_i \\ 1 & \text{se, } Y_i > T_i = U_i \end{cases} \quad (4.9)$$

sendo, L_i , U_i e T_i os valores inferior, superior e alvo, respectivamente, que são desejados para a resposta com $L_i \leq T_i \leq U_i$. O expoente s é o peso determina o quão importante é obter o valor alvo T_i . Para $s = 1$, a função aumenta linearmente em direção a T_i . Grandes valores de s devem ser selecionados se for muito desejável que o valor predito estar próximo de T_i ou aumentar rapidamente acima de L_i . Por outro lado, pequenos valores de s devem ser escolhidos se qualquer valor predito acima de L_i e abaixo de U_i for aceitável ou se valores consideravelmente acima de L_i não são de importância crítica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.Dados experimentais

Os resultados da redução decimal de células observadas na sanitização CIP com fluxo pulsado nas diferentes configurações de pulso são apresentados na Tabela 4.2. De modo geral, a ramificação tê foi a geometria que apresentou as menores reduções decimais na contagem de células em função da zona de recirculação e estagnação de fluido no interior da geometria. Silva et al. (2023) discutiram que a higienização com fluxo pulsado em regiões com zonas de recirculação de fluido, como na ramificação em tê, apresentaram menores reduções decimais na contagem de células de *Bacillus cereus*.

Tabela 4. 2 - Configurações de fluxo pulsado e redução decimal observada.

Exp.	Variáveis codificadas				Redução decimal [-]				
	A	B	C	D	TR	TÊ	COT	EXP	RED
1	1	1	1	-1	4,92	1,87	4,35	5,81	4,87
2	1	1	-1	-1	5,01	2,2	4,43	5,63	5,26
3	1	-1	1	1	5,27	2,28	3,64	5,94	6,01
4	-1	1	-1	1	4,13	2,45	2,79	5,4	5,33
5	1	-1	-1	1	5,6	2,53	4,67	5,22	5,97
6	-1	-1	1	-1	4,69	2,38	4,72	5,71	5,87
7	-1	1	1	1	4,1	2,82	6,13	5,96	5,96
8	-1	-1	-1	-1	4,69	2,49	6,3	5,51	6,03
9 (C)	0	0	0	0	6,02	3,6	5,83	6,12	6,01
10	-2	0	0	0	4,69	1,69	5,02	5,17	5,5
11	2	0	0	0	4,89	3,19	5,39	5,84	6,42
12	0	-2	0	0	5,24	2,67	4,13	5,07	5,79
13	0	2	0	0	5,92	2,86	4,29	5,28	5,64
14	0	0	-2	0	4,7	3,32	5,3	5,59	5,99
15	0	0	2	0	4,98	2,9	5,05	6,32	6,02
16	0	0	0	-2	3,34	1,83	3,26	5,79	4,34
17	0	0	0	2	4,19	2,52	5,39	5,89	5,58
18 (C)	0	0	0	0	5,71	4,04	6,17	6,3	6,29
19 (C)	0	0	0	0	5,37	3,96	6,3	6,01	5,92
20	1	1	-1	1	5,44	2,73	5,58	6,31	6,43
21	-1	1	1	-1	4,74	1,7	4,02	5,6	5,43
22	1	-1	1	-1	4,1	1,43	3,83	5,82	5,12
23	2	1	-2	2	4,72	2,23	4,3	5,66	5,19
24	1	1	-1	1	5,44	2,73	5,58	6,31	6,43

3.2.Determinação do número de neurônios

Não há uma fórmula geral para seleção do número de neurônios ocultos na arquitetura das redes neurais BP. Os trabalhos com redes neurais selecionaram o número de neurônios ocultos em função da redução da variação do erro quadrático médio tais como os relatados por Cheng et al. (2016); Najafi et al. (2018). Nesse sentido, a Fig. 4.4

ilustra os erros quadráticos médio da rede neural BP com quatro fatores de entrada. O modelo foi treinado com diferentes números de neurônios ocultos (entre 1 e 50) para 30 iterações. O aumento do número de neurônios ocultos e os erros quadráticos médio dos dados estavam fluando, mas de modo geral apresentaram declínio. A partir de 30 neurônios, a oscilação foi reduzida e os erros relativos médios não se alteram. Assim, 30 neurônios ocultos foram selecionados para treinar os modelos de rede neural BP.

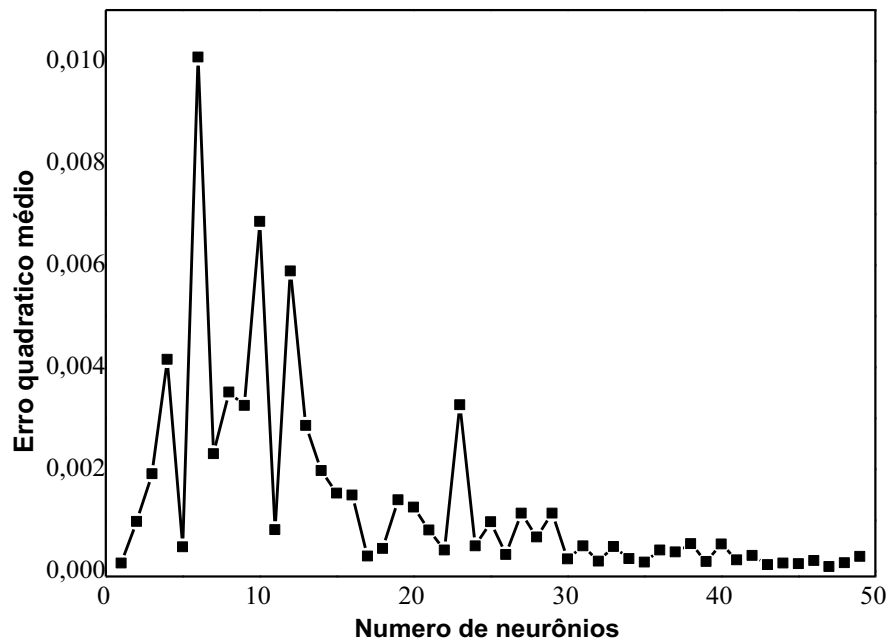


Figura 4. 4 - Erro quadrático médio em função do número de neurônios.

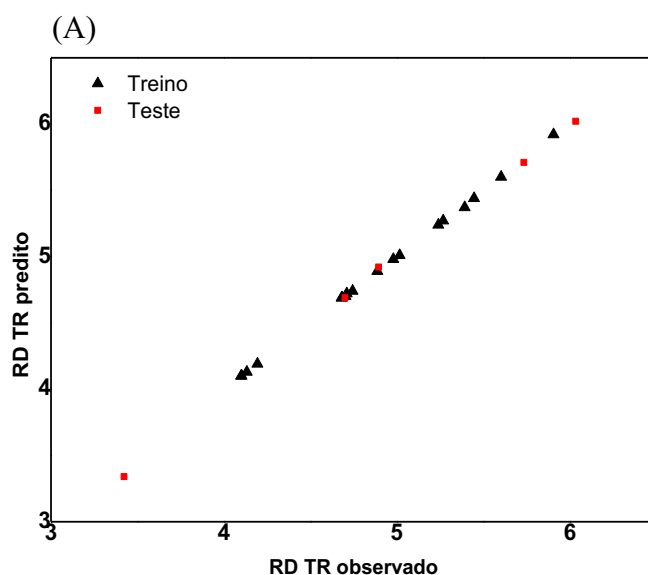
3.3. Predição da redução decimal

Os dados experimentais foram aleatoriamente divididos em duas partes: uma parte dos dados foram usados para treinar a rede, e a outra parte, que não foi incluída no treinamento das redes neurais, foi usada para examinar a capacidade preditiva da rede. Depois de ser treinado e testado nos modelos de rede neural com diferentes combinações de fatores de entrada para tempo de sanitização, ondulação, período de pulso e concentração do agente químico sanitizante, a média relativa dos erros dos dados de treinamento e dados de teste são mostrados na Tabela 4.3.

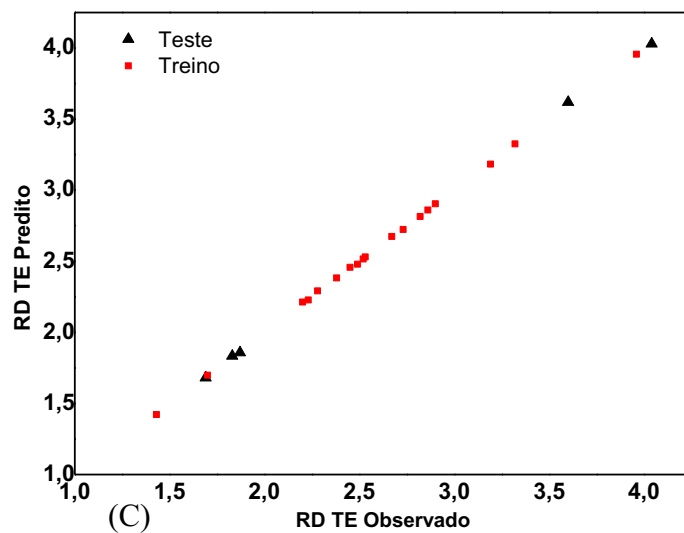
Tabela 4. 3 - Parâmetros de acurácia no modelo RNA para os dados treino e teste.

	TR	TE	COT	EXP	RED
Erro quadrático médio - treino	3,58 E-5	3,52 E-5	3,52 E-5	9,37 E-6	2,11 E-5
Erro quadrático médio - teste	3,50 E-3	2,00 E-4	5,0 E-4	2,88E-5	1,00 E-3
R ² treino	0,9998	0,9998	0,9999	0,9999	0,9999
R ² teste	0,9962	0,9993	0,9993	0,9997	0,9982

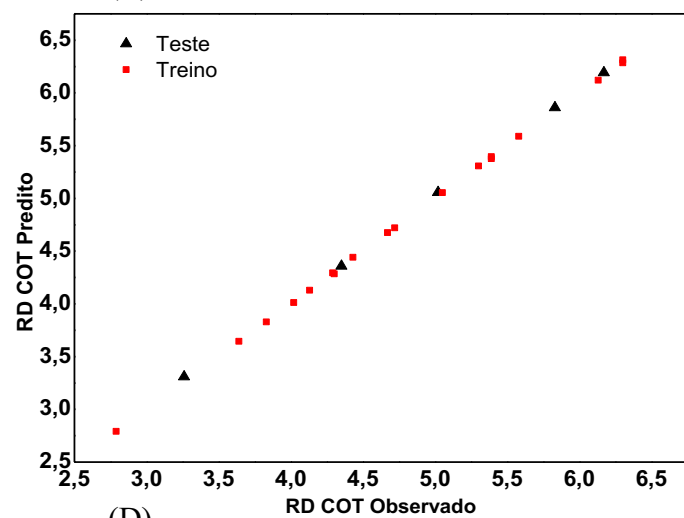
Com base nos parâmetros de acurácia da Tab. 4.3, observa-se que os modelos de redes neurais, com diferentes combinações dos fatores de entrada apresentaram quadrático médio pequeno ($< 0,001$) para todas as geometrias e, portanto, boa previsibilidade dos resultados, conforme mostrado nas Figs. 4.5A a 4.5E. Esse fenômeno ocorre porque a arquitetura da rede de neurônios consegue capturar e combinar os fatores relevantes no processo de sanitização com fluxo pulsado.



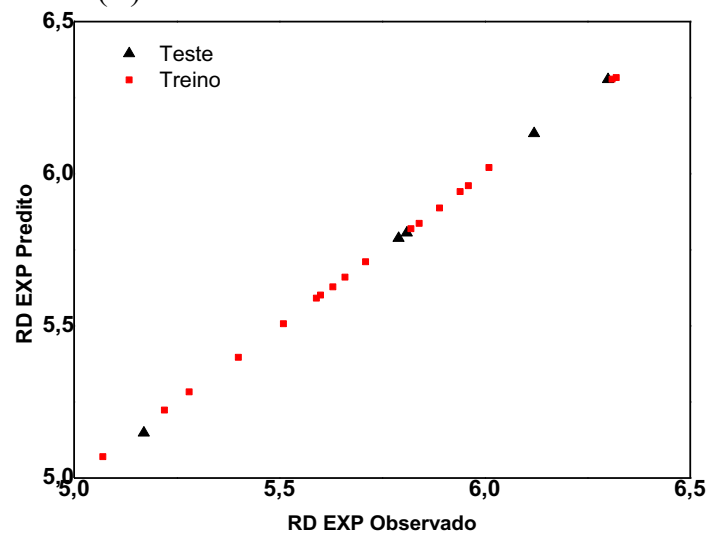
(B)



(C)



(D)



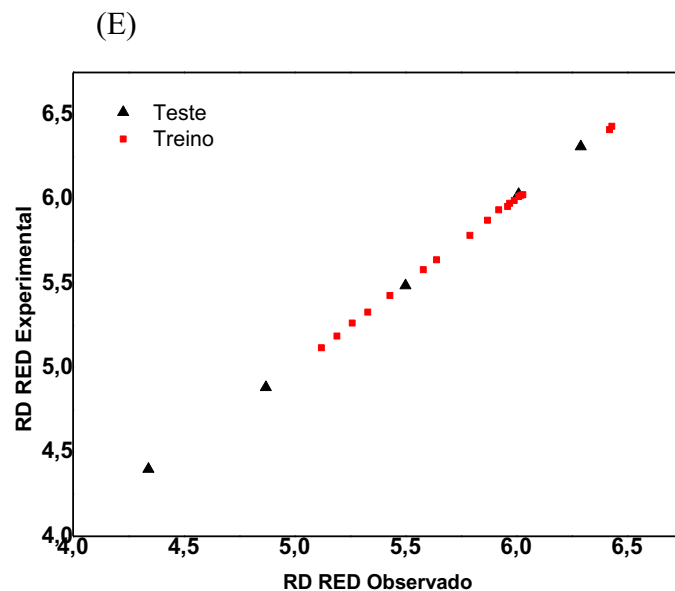


Figura 4. 5 - Correlação entre os valores de dados usados e as saídas previstas para trecho reto (a), ramificação em tê (b), cotovelo (c), expansão (d) e redução (e) do conjunto de dados treino e teste.

3.4.Comparativo entre RNA e RMS

Nas figuras 4.6A e Fig. 4.6B são mostrados os parâmetros de qualidade do ajuste dos modelos identificados pela regressão polinomial pela técnica RMS do Capítulo 3 e pela de rede neural. Os modelos de rede neural BP alcançaram consideravelmente melhores resultados do que a análise de regressão polinomial. Este resultado mostra que existe um forte não linearidade entre as condições da sanitização pulsada como fatores de entrada da rede neural, enquanto o BP rede neural fornece um método de revelar essa relação de não linearidade.

Nesse contexto, os menores valores de RMSE para RNA e os maiores coeficientes de correlação R^2 para as respostas investigadas demonstram a superioridade da RNA sobre o RSM na previsão dos resultados. Bello e Olafadehan (2021) argumentaram que a técnica de RNA de fato apresenta-se como uma ferramenta poderosa para modelagem de processos sem considerações sobre o mecanismo fenomenológico associado e não emprega uma matemática aprofundada como no uso do RSM para o desenvolvimento de um modelo de regressão não linear quadrática. Waday et al. (2022) estudaram comparativamente a capacidade preditiva da RNA e da técnica RMS e concluíram que os altos valores dos coeficientes de correlação ($R > 0,98$) mostraram que o modelo RNA apresenta melhor regressão e ajuste em comparação com o modelo RSM.

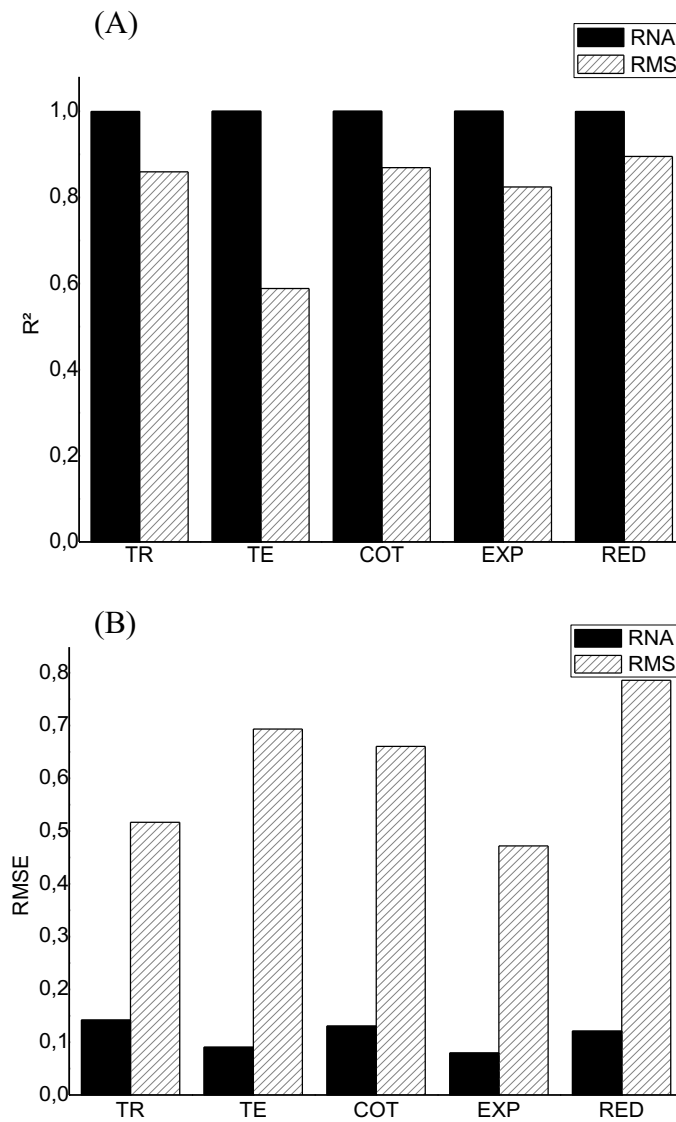


Figura 4. 6 - Comparativo dos parâmetros de acurácia para modelagem RNA e RMS. – (a) coeficiente de correlação R^2 (b) parâmetro RMSE.

3.5.Otimização da sanitização com modelo RNA

A otimização multivariável maximizou a remoção e destruição de células de *L. innocua* no interior das geometrias por meio da função desejabilidade. O ponto ótimo para sanitização foi estimado utilizando a RNA. A combinação ótima de tempo (A), ondulação (B), período (C) e concentração (D) em variáveis codificadas foram:

$$\begin{bmatrix} A \\ B \\ C \\ D \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,27 \\ 0,35 \\ -0,36 \\ -0,12 \end{bmatrix}$$

Em variáveis reais, essa combinação representa a seguinte condição:

$$\begin{bmatrix} \textit{Tempo} \\ \textit{Ondulação} \\ \textit{Período} \\ \textit{Concentração} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 9,7 \\ 1,1 \\ 54,0 \\ 57,0 \end{bmatrix}$$

Assim, essa combinação de variáveis de entrada determinada pelo modelo RNA e pela função desejabilidade, indicou as reduções decimais médias esperadas nas geometrias, conforme apresentado na Tabela 4.4. Além disso, é apresentado o resultado observado na redução decimal na mesma condição do processo CIP. A proximidade entre o valor estimado pela rede neural no ponto ótimo e o resultado experimental demonstrou a precisão desta estratégia em modelar e otimizar o processo de sanitização com fluxo pulsado.

Tabela 4. 4 - Comparativo na redução decimal (RD) de células de *L. innocua* nas diferentes geometrias estimada pela RNA e o valor observado.

Geometria	Estimado	Observado
TR	5,32	6,07 ± 0,17
TÊ	3,64	3,54 ± 0,41
COT	5,41	5,26 ± 0,26
EXP	5,88	6,29 ± 0,44
RED	5,63	6,12 ± 0,56

4. CONCLUSÃO

As reduções decimais de células de *L. innocua* após a sanitização com fluxo pulsado no processo CIP podem ser previstas com precisão por modelos de rede neural BP com base nas configurações de tempo de circulação do agente químico sanitizante, na ondulação, período do pulso e concentração de sanitizante. O modelo de rede neural BP apresentou erros quadráticos médios de pequena magnitude. Comparativamente, os resultados preditos pela RNA foram consideravelmente mais precisos do que aqueles dados por polinômios quadráticos regressão. Embora os modelos de rede neural BP não possam fornecer informações claras descrições matemáticas de parâmetros de entrada e saída, estes modelos podem prever com precisão os resultados da redução decimal de

células de *L. innocua*. Assim, os modelos de redes neurais BP são promissores para futuras aplicações industriais no contexto da higienização CIP.

5. REFERÊNCIAS

Bello, V. E., e Olafadehan, O. A. (2021). Comparative investigation of RSM and ANN for multi-response modeling and optimization studies of derived chitosan from *Archachatina marginata* shell. *Alexandria Engineering Journal*, 60(4), 3869–3899. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2021.02.047>

Bremer, P.J., Fillery, S., McQuillan, A.J. (2006). Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 254–262. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., e Whiting, R. C. (2018). Corrigendum to “A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments” [Food Control 75 (May 2017) 1–13]. *Food Control*, 88, 236. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2018.01.004>

Carpentier, B., e Cerf, O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8. <http://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>

Cheng, J., Wang, X., Si, T., Zhou, F., Zhou, J., e Cen, K. (2016). Ignition temperature and activation energy of power coal blends predicted with back-propagation neural network models. *Fuel*, 173, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.01.043>

Choi, B., Lee, J.-H., e Kim, D.-H. (2008). Solving local minima problem with large number of hidden nodes on two-layered feed-forward artificial neural networks. *Neurocomputing*, 71(16–18), 3640–3643. <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2008.04.004>

Costa, A., Lourenco, A., Civera, T., e Brito, L. (2018). *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* strains from dairy plants behave similarly in biofilm sanitizer testing. *LWT*, 92, 477–483. <http://doi:10.1016/j.lwt.2018.02.073>

Davey, K. R., Chandrakash, S., e O'Neill, B. K. (2013). A new risk analysis of Clean-In-Place milk processing. *Food Control*, 29(1), 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.014>

Deleplace, M., Dallagi, H., Dubois, T., Richard, E., Ipatova, A., Bénézech, T., e Faille, C. (2022). Structure of deposits formed by drying of droplets contaminated with *Bacillus* spores determines their resistance to rinsing and cleaning. *Journal of Food Engineering*, 318, 110873. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110873>

Escrig, J., Woolley, E., Simeone, A., e Watson, N. J. (2020). Monitoring the cleaning of food fouling in pipes using ultrasonic measurements and machine learning. *Food Control*, 116, 107309. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107309>

Gago, J., Martínez-Núñez, L., Landín, M., e Gallego, P. P. (2010). Artificial neural networks as an alternative to the traditional statistical methodology in plant research. *Journal of Plant Physiology*, 167(1), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.007>

Hammer, P., Bockelmann, W., e Hoffmann, W. (2017). Fate of *Listeria innocua* during production and ripening of smeared hard cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 7846–7856. <http://doi:10.3168/jds.2017-12823>

Hua, Z., Younce, F., Tang, J., Ryu, D., Rasco, B., Hanrahan, I., e Zhu, M.-J. (2021). Efficacy of saturated steam against *Listeria innocua* biofilm on common food-contact surfaces. *Food Control*, 125, 107988. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107988>

Inanoglu, S., Barbosa-Cánovas, G. V., Patel, J., Zhu, M.-J., Sablani, S. S., Liu, F., ... Tang, J. (2021). Impact of high-pressure and microwave-assisted thermal pasteurization on inactivation of *Listeria innocua* and quality attributes of green beans. *Journal of Food Engineering*, 288, 110162. <http://doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110162>

Portillo Juan, N., e Negro Valdecantos, V. (2022). Review of the application of Artificial Neural Networks in ocean engineering. *Ocean Engineering*, 259, 111947. <https://doi.org/10.1016/j.oceaneng.2022.111947>

Kabir, M. N., Aras, S., George, J., Wadood, S., Chowdhury, S., e Fouladkhah, A. C. (2021). High-pressure and thermal-assisted pasteurization of habituated, wild-type, and pressure-stressed *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Staphylococcus aureus*. *LWT*, 137, 110445. <http://doi:10.1016/j.lwt.2020.110445>

Li, G., Hall, P., Miles, N., e Wu, T. (2015). Improving the efficiency of “Clean-In-Place” procedures using a four-lobed swirl pipe: A numerical investigation. *Computers e Fluids*, 108, 116–128. <http://doi:10.1016/j.compfluid.2014.11.032>

Najafi, A., Nowruzi, H., e Ghassemi, H. (2018). Performance prediction of hydrofoil- supported catamarans using experiment and ANNs. *Applied Ocean Research*, 75, 66–84. <https://doi.org/10.1016/j.apor.2018.02.017>

Reichler, S. J., Murphy, S. I., Erickson, A. W., Martin, N. H., Snyder, A. B., e Wiedmann, M. (2020). Interventions designed to control postpasteurization contamination in high-temperature, short-time-pasteurized fluid milk processing facilities: A case study on the effect of employee training, clean-in-place chemical modification, and preventive maintenance programs. *Journal of Dairy Science*, 103(8), 7569–7584. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18186>

Sharma, S., Sharma, S., e Athaiya, A. (2020). Activation functions in neural networks. *International Journal of Engineering Applied Sciences and Technology*, 04(12), 310–316. <https://doi.org/10.33564/ijeast.2020.v04i12.054>

Sh, M. M., Ghassemi, H., e Nowruzi, H. (2017). Using computational fluid dynamic and artificial neural networks to predict the performance and cavitation volume of a

propeller under different geometrical and physical characteristics. *Journal of Marine Engineering eamp; Technology*, 17(2), 59–84. <https://doi.org/10.1080/20464177.2017.1300983>

Silva-Angulo, A. B., Zanini, S. F., Rodrigo, D., Rosenthal, A., e Martinez, A. (2014). Growth kinetics of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* under exposure to carvacrol and the occurrence of sublethal damage. *Food Control*, 37, 336–342. <http://doi:10.1016/j.foodcont.2013.09.050>

Silva, L. D., Filho, U. C., Naves, E. A. A., e Gedraite, R. (2020). Pulsed flow in clean-in-place sanitization to improve hygiene and energy savings in dairy industry. *Journal of Food Process Engineering*, 44(1). <http://doi:10.1111/jfpe.13590>

Silva, L. D., Aguiar, M. M., Paiva, A. D., Bernardes, P. C., Gedraite, R., e Naves, E. A. A. (2023). Optimization of clean-in-place (CIP) procedure of pipelines contaminated with *Bacillus cereus* by applying pulsed flow. *Food Control*, 147, 109565. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109565>

Sislian, R., da Silva, F. V., Coghi, M. A., e Gedraite, R. (2021). Neuro-fuzzy model-based simulation of a laboratory scale clean-in-place system: A study of the rinsing process. *Environmental Challenges*, 4, 100098. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100098>

Viswanathan, P., Gosukonda, J. S., Sherman, S. H., Joshee, N., e Gosukonda, R. M. (2022). Prediction of In vitro organogenesis of *Bacopa monnieri* using artificial neural networks and regression models. *Heliyon*, 8(12), e11969. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11969>

Waday, Y. A., Aklilu, E. G., Bultum, M. S., e Ancha, V. R. (2022). Optimization of soluble phosphate and IAA production using response surface methodology and ANN approach. *Heliyon*, 8(12), e12224. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12224>

Zhang, Z., Ma, X., e Yang, Y. (2003). Bounds on the number of hidden neurons in three-layer binary neural networks. *Neural Networks*, 16(7), 995–1002. [https://doi.org/10.1016/s0893-6080\(03\)00006-6](https://doi.org/10.1016/s0893-6080(03)00006-6)

CAPÍTULO V

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O processo de higienização *clean in place* (CIP) apresenta diversas etapas e inúmeros fatores envolvidos em cada uma delas. Além disso, há outras possibilidades de pulsos, microrganismos e tecnologias para remoção e destruição dos microrganismos no processo CIP. Dessa forma, algumas sugestões para trabalhos futuros nesta linha de pesquisa são:

- Investigar outras combinações de pulso: ondulação e período.
- Avaliar o uso do fluxo pulsado na sanitização com outros agentes sanitizantes, usualmente empregados na indústria, tais como: hipoclorito de sódio e compostos a base de amônia quaternária.
- Associar o fluxo pulsado às superfícies funcionalizadas com plasma, nanopartículas e óxidos metálicos.
- Estudar o efeito do fluxo pulsado na higienização CIP sobre outros microrganismos recorrentes na indústria de processamento de alimentos.