

Santiago Cadena Carrera

**VALIDAÇÃO DO PROCESSO CIP COMO FERRAMENTA
PARA MELHORAR A QUALIDADE E A PRODUTIVIDADE:
ESTUDO DE CASO EM MICROCERVEJARIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de em Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Müller

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Rossi

Coorientador: Profª. Dra. Gabriela Müller

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Cadena Carrera, Santiago Esmiro

Validação do processo CIP como ferramenta para melhorar a qualidade e a produtividade : Estudo de caso em microcervejaria / Santiago Esmiro Cadena Carrera ; orientador, José Miguel Müller ; coorientador, Márcio Rossi. - Florianópolis, SC, 2015.

108 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. CIP (Cleaning in place). 3. Validação limpeza. 4. Cerveja. I. Müller, José Miguel. II. Rossi, Márcio. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Validação do processo CIP como ferramenta para melhorar a qualidade e a produtividade: estudo de caso em microcervejaria

Por

Santiago Cadena Carrera

Dissertação julgada para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. José Miguel Müller
Orientador

Prof. Dr. Márcio Rossi
Coorientador

Prof.^a. Dr.^a. Gabriela Müller
Coorientador

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof.^a Elane Prudêncio, Dr.^a

Prof.^a Silvana Licodiedoff, Dr.^a

Prof. Juliano De Dea Lindner, Dr.

Prof. Marcelo Lanza, Dr.

*“Imagination is more important than knowledge. Knowledge is limited.
Imagination encircles the world.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar cada momento da minha vida.

A minha família, minha mãe Lucila Carrera, minha irmã Elva e meus irmãos Marlon e Jaime por acreditar em mim, e todo seu apoio.

A Rosita Lema... por tudo.

Ao governo da Republica do Equador, Ec. Rafael Correa e a “Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnologia SENESCYT” do Equador pelo apoio financeiro que permitiu a realização do meu mestrado e este trabalho.

À minha orientadora professora Gabriela Müller, por toda a dedicação, paciência e os conhecimentos repassados.

Aos meus orientadores: professor José Miguel Müller e professor Márcio José Rossi, pela confiança, dedicação, incentivo, disponibilidade, apoio e momentos de descontração.

Aos membros da banca: Profa. Dra. Elane Schwinden Prudêncio, Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner e Prof. Dr. Marcelo Lanza pelas sugestões que permitiram aprimorar este trabalho.

Ao Departamento MIP-UFSC pelo apoio de infraestrutura, que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Proprietário da microcervejaria, Sr. R.N. que permitiu o desenvolvimento deste trabalho em sua empresa.

RESUMO

O processo de limpeza CIP ou (*Cleaning in place*) apresenta um papel importante na indústria química e de alimentos, pois a qualidade e segurança dos produtos produzidos somente são possíveis se for executado um CIP que permita a remoção eficaz de qualquer resíduo químico, orgânico ou microbiológico dos equipamentos e/ou linhas de processo. Nesse sentido a validação do CIP é uma ferramenta que permite garantir que os níveis de limpeza obtidos após o CIP sejam apropriados otimizando o consumo de químicos, água e energia usados, contribuindo assim à qualidade e produtividade do processo de produção. Com o objetivo de avaliar as condições atuais do processo de limpeza CIP de um fermentador em uma microcervejaria, empregou-se a metodologia proposta pela *European Hygienic Engineering Design Group* (EHEDG) para validação do processo CIP. Realizou-se a qualificação das instalações, verificou-se se os equipamentos e as instalações seguem as sugestões de desenho higiênico, e analisaram-se pontos mortos que provocam um processo CIP ineficiente. Realizou-se a qualificação operacional, onde as condições atuais de processo CIP contemplam a temperatura de 24 °C (ambiente), titulação de 1,3% (m/m), vazão de 500–2500 L/h, e tempo de 130 minutos. Realizou-se a qualificação do desempenho e os níveis de limpeza obtidos depois do CIP mediante a quantificação do ATP (adenosina trifosfato). Os resultados obtidos com o ATP se encontraram em uma faixa muito ampla, de 33-679 RLU (unidades relativas de luz), característica de um processo de limpeza muito variável ou fora de controle. Avaliou-se a eficiência do processo mediante a quantificação dos recursos empregados durante o CIP e o uso de indicadores chave de desempenho ou KPIs. Dos custos totais no processo CIP, 50,3 é devido aos insumos químicos, 41,4% devido à mão de obra, 5,4% à água e 2,8% a energia. O consumo de energia e água por m³ de cerveja produzida são 2,42 kWh e 0,310 m³ respectivamente. Mediante experimentos feitos em laboratório para avaliar a remoção de um biofilme, produzido pela bactéria *Acetobacter aceti*, depois de um processo CIP verificou-se concordância entre os valores obtidos mediante a quantificação do ATP e métodos de contagem em placas (UFC). Os fatores determinantes para os experimentos do CIP em laboratório foram: a concentração (0,1% m/m) e a temperatura (34° C) que permitiram (nessas condições) a remoção do 94,86% do biofilme ou uma redução logarítmica de 1,2.

Palavras-chave: CIP (*Cleaning in place*), validação Limpeza, cerveja

ABSTRACT

The cleaning process or CIP has a very important role in the food and chemical industry, because the quality and safety of the products manufactured are only possible if the cleaning process removes any chemical, organic or microbiological residue of the equipments and/or processing lines. In this way the CIP validation is a tool which allows to guarantee that the cleanliness levels after the CIP are adequate, optimizing the use of chemicals, water and energy improving the quality and productivity of production process. With the aim of validate the real conditions of the cleaning process of a brewing tank in a micro brewing, the methodology proposed by *European Hygienic Engineering Design Group* (EHEDG) was used for implementing the validation of the CIP. Was implemented the installation qualification, the equipments and installations were checked in accordance with hygienic design, was found dead ends which produce an inefficient cleaning process. Was made a operational qualification, the current cleaning process parameters are: temperature: 27 (°C), titration: 1,3% (m/m), flow: 500l/h – 2500 l/h, time: 130 minutes. The performance qualification was made, the cleanliness levels were verified with by means of a quantification of ATP (adenosine triphosphate), the results of ATP were within a too wide range 33-679 RLU (relative light units) which corresponds to an uncontrolled or too variable cleaning process. The efficiency of the cleaning process was checked, by means of quantification of the resources used in the CIP and by means of key performance indicators or KPIs. The direct operational cost were determined, cleaning agents represent 50,3%, 41,4% labor, 5,4% fresh water and 2,8% electrical energy. The electrical energy and water consumption per m³ of beer are 2,42 kWh and 0,310 m³ respectively. By means of experiments in laboratory for checking the removal of a biofilm produced by the bacteria *Acetobacter aceti*, after a CIP process, it was found concordance between the data of quantification of ATP and traditional methods for quantification of microorganisms (UFC plate and counting). The determinant factors for the CIP simulation were titration (0,1% m/m) and temperature (34° C) which allowed the removal of 94,86% of the biofilm or a logarithmic reduction of 1,2.

Keywords: CIP (Cleaning in place), Cleaning validation, beer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Formação do biofilme.....	35
Figura 2.2. O círculo de Sinner e inter-relação dos parâmetros de limpeza.....	41
Figura 2.3. Dilema da escolha entre tempo de limpeza e tempo de produção.....	42
Figura 2.4. Impacto da temperatura na concentração do NaOH	43
Figura 2.5. Efeito da concentração de NaOH no tempo de limpeza.....	46
Figura 2.6. Efeito da concentração de HNO ₃ no tempo de limpeza de amido.....	47
Figura 2.7. Força cortante em tubulações para diferentes velocidades .	49
Figura 2.8. Relação entre o tempo de limpeza e velocidade das soluções	51
Figura 2.9. Formação da camada laminar nas paredes de tanques	51
Figura 2.10. Soldadura higiênica.....	53
Figura 2.11. Efeito do comprimento de uma derivação	54
Figura 2.12. Desenho de equipamentos self-drining	55
Figura 2.13. Tubulações self-drining	56
Figura 2.14. Acessórios com desenho higiênico: reduções	56
Figura 2.15. Acessórios com desenho higiênico: válvulas.....	57
Figura 2.16. Sistema CIP tipo uso único	59
Figura 2.17. Sistema CIP tipo recuperação parcial	60
Figura 2.18. Sistema CIP tipo recuperação completa.....	61
Figura 2.19. Processo de validação geral	63
Figura 3.1. Processo de validação simplificado para linhas ou processos existentes.....	66
Figura 3.2. Alternativas para avaliação da limpeza de superfícies.....	68

Figura 3.3. Equipamento Micro brewing system	71
Figura 4.1 Detalhamento do procedimento de enxágue do fermentador. Os jatos de água do spray-ball não atingem as paredes do tanque.....	78
Figura 4.2 Detalhamento de dispositivos do tanque de fermentação a ser incluídos no CIP/COP; a) válvula de amostragem, b) gaxetas da porta do tanque, c) saída lateral do tanque, d) válvulas do medidor de nível.....	79
Figura 4.3 Pontos de coleta de amostras com swab no tanque.	80
Figura 4.4 Distribuição dos custos do CIP.....	82
Figura 4.5 Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis concentração de hidróxido de sódio, temperatura e vazão, bem como as interações entre estas variáveis, na redução logarítmica das UFC ($p < 0,05$) para a placa posicionada na parte superior do tanque.	87
Figura 4.6 Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis concentração de hidróxido de sódio, temperatura e vazão, bem como as interações entre estas variáveis, na redução logarítmica da RLU ($p < 0,05$) para a placa posicionada na parte superior do tanque.	87
Figura 4.7 Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis concentração de hidróxido de sódio, temperatura e vazão, bem como as interações entre estas variáveis, na redução logarítmica das UFC ($p < 0,05$) para a placa posicionada na parte inferior do tanque.	89
Figura 4.8 Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis concentração de hidróxido de sódio, temperatura e vazão, bem como as interações entre estas variáveis, na redução logarítmica das UFC ($p < 0,05$) para a placa posicionada na parte inferior do tanque..	89
Figura A1. Diagrama P&I do tanque fermentador na micro-cervejaria	102
Figura B.1 Detalhamento do Tanque de Fermentação a) Fotografia do Tee, b) Medidas da região [mm].....	103
Figura B.2 Detalhe do manômetro acoplado ao tanque de fermentação a) Fotografia do manômetro atual b) Imagem de manômetro com desenho sanitário.....	104

Figura B.3 Detalhe da válvula de alimentação de CIP do tanque de fermentação. a) Fotografia de válvula tipo esfera, b) Regiões da válvula tipo esfera onde há acumulação de resíduos.....	104
Figura B.4 Detalhe da parte interna do fermentador. Fotografia do acabamento superficial das soldagens.....	105
Figura B.5 Detalhe do medidor de nível do tanque de fermentação. a) Fotografia do medidor de nível tipo “mangueira”, b) Diagrama do medidor.....	106
Figura B.6 Detalhe do ponto morto existente nas conexões com mangueira.....	106
Figura C.1 Diagrama do processo CIP atual, a) enchimento/enxágue b) recirculação	108

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 2.1. Bactérias deteriorantes da cerveja tipo Gram-negativas ..	37
Quadro 2.2. Bactérias deteriorantes da cerveja tipo Gram-positivas ...	38
Quadro 2.3. Leveduras selvagens	39
Quadro 2.4. Composição da sujeira na produção de cerveja.....	39
Quadro 2.5. Natureza da sujeira	44
Tabela 3.1 Níveis das variáveis no ensaio de laboratório	71
Tabela 4.1 Parâmetros do processo CIP atual.....	76
Tabela 4.2 Concentração de ATP (RLU) em pontos críticos do fermentador. Resultados do CIP atual.....	80
Tabela 4.3 Materiais utilizados no procedimento CIP	81
Tabela 4.4 Indicadores chave de desempenho KPI calculados para o processo CIP atual.....	81
Tabela 4.5 Variação da concentração das soluções de limpeza antes e depois do CIP.....	83
Tabela 4.6 Matriz de planejamento fatorial completo 2^3 , com os valores iniciais das variáveis em termos unidades formadoras de colônias UFC/cm ² e a concentração de ATP medido em RLU/cm ² para as placas de prova superior e inferior, após um CIP de 3 min.	85
Tabela 4.7 Respostas em termos de redução logarítmica das UFC/cm ² (R log) e redução logarítmica da RLU (R logRLU) para a placa posicionada na parte superior e inferior do tanque depois de um processo CIP de 3 minutos.....	86
Tabela D.1 Análise de variância para os modelos empíricos da remoção do biofilme depois do processo CIP de 3 minutos	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AISI	American Iron and steel institute
ANOVA	Análise de variância
APIC	Active Pharmaceutical Ingredients Committee
ATNCs	Total aparente de compostos n- nitrosos
ATP	Adenosina trifosfato
CFD	Dinâmica de fluidos computacional
CIP	Cleaning in place (Limpeza no local)
COP	Cleaning out of place (Limpeza fora do sitio)
DMS	Dimetil sulfeto
DQ	Qualificação do desenho
EDTA	Ácido tetra- acético etileno diamina
EHEDG	European Higienic Engineering and Design Group
FDA	Food and drug administration
GTAW	Gas tungsten arc welding
HHI	Índice Herfindhal-Hirschman
IDS	Imidodisuccinato
IQ	Qualificação das instalações
ISO	International organization for standardization
KPI	Key performance indicator
MIP	Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
NTA	Agentes nitrilo-triacelato
OQ	Qualificação operacional
PID / P&I	Diagrama de tubulação e instrumentação
POP	Procedimento operacional padrão
PQ	Qualificação do desempenho
RLU	Unidades relativas de luz
RMSE	Raiz do erro quadrático médio
SINDICERV	Sindicato nacional da indústria da cerveja
SMM	S-methylmethionine
TIG	Tugsten inert gas
UFC	Unidade formadora de colônias

NOMENCLATURAS

A	Área das placas de prova (cm ²)
B	Bomba
CT	Transmissor de condutividade
d	Fator de diluição
F	Filtro
HL	Sensor para nível alto
H+	Íons hidrogênio
Log r	Redução logarítmica das células viáveis
L/D	Relação comprimento/diâmetro de tubulação
LL	Sensor para nível baixo
NA	Número de colônias por cm ²
NV	Número de colônias por mL de amostra
OH-	Íons hidróxido
Ra	Rugosidade média (µm)
TM	Marca registrada
TX	Transmissor de temperatura
V	Válvula
V	volume a amostra (mL)
4T	Fatores do CIP (temperatura, titulação, tempo, turbulência)
ΣC	Somatório das UFC

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	OBJETIVOS.....	26
1.1.1	Objetivo Geral	26
1.1.2	Objetivos Específicos.....	26
2	REVISAO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA	27
2.1.1	Produção e adequação do mosto	27
2.1.1.1	Moagem	27
2.1.1.2	Brassagem.....	28
2.1.1.3	Clarificação	29
2.1.1.4	Fervura.....	29
2.1.1.5	Whirlpool.....	29
2.1.1.6	Resfriamento/Areação.....	30
2.1.2	Fermentação e maturação	30
2.1.2.1	Adição da levedura	30
2.1.2.2	Fermentação.....	30
2.1.2.3	Maturação	31
2.1.2.4	Enchimento e pasteurização.....	31
2.2	QUALIDADE DA CERVEJA	31
2.2.1	Cor e turbação	32
2.2.2	Sabor.....	32
2.2.3	Espuma.....	32
2.3	O PROCESSO DE LIMPEZA	32
2.3.1	Depósitos orgânicos	33
2.3.1.1	Carboidratos.....	33
2.3.1.2	Compostos nitrogenados e lipídeos.....	34
2.3.2	Depósitos inorgânicos.....	34
2.3.3	Depósitos microbiológicos.....	34
2.4	LIMPEZA FORA DO LOCAL COP (CLEANING OUT OF PLACE).....	40

2.4.1	 Etapas do COP	40
2.5	LIMPEZA NO LOCAL CIP (CLEANING IN PLACE) ..	41
2.5.1	 Primeiro T: Tempo	42
2.5.2	 Segundo T: Temperatura	43
2.5.3	 Terceiro T: Titulação.....	44
2.5.3.1	Detergentes alcalinos	45
2.5.3.1.1	<i>Peptização.....</i>	<i>45</i>
2.5.3.1.1	<i>Saponificação.....</i>	<i>45</i>
2.5.3.2	Detergentes ácidos	46
2.5.3.3	Aditivos surfactantes	48
2.5.3.4	Quelantes ou sequestrantes	48
2.5.4	 Quarto T: Turbulência	49
2.5.5	 Quinto T: Tecnologia - Desenho higiênico	52
2.5.5.1	Material de construção.....	52
2.5.5.2	Geometria dos equipamentos.....	53
2.5.5.3	Limpeza	57
2.5.6	 Sexto T: Treinamento	58
2.6	CONFIGURAÇÕES DO SISTEMA CIP	58
2.6.1	 Sistemas de uso único.....	58
2.6.2	 Sistemas de recuperação.....	59
2.6.2.1	Sistemas com recuperação parcial	59
2.6.2.1	Sistemas com recuperação total.....	60
2.7	A VALIDAÇÃO DO PROCESSO CIP	61
2.7.1	 Qualificação das instalações	63
2.7.2	 Qualificação operacional	64
2.7.3	 Qualificação do desempenho.....	64
2.6.4	 Relatório final.....	65
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
3.1	VALIDAÇÃO DO PROCESSO CIP DE FERMENTADOR	66
.....	66
3.1.1	 Qualificação das instalações	67
3.1.2	 Qualificação operacional	67

3.1.3	Qualificação do desempenho	67
3.1.3.1	Análise do ATP	68
3.1.3.2	Indicadores chave de desempenho ou KPIs do CIP	68
3.2	EXPERIMENTOS DO CIP EM LABORATÓRIO	69
3.2.1	Microorganismo	69
3.2.2	Meios de propagação e cultivo.....	69
3.2.3	Placas de prova	69
3.2.4	Formação de biofilme.....	70
3.2.5	Equipamento.....	70
3.2.6	Processo CIP	71
3.2.7	Avaliação do processo CIP	72
3.2.7.1	Análise microbiológica	72
3.2.7.2	Análise do ATP.....	73
3.2.8	Quantificação da remoção do biofilme	73
3.2.9	Análises estatísticas	73
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1	VALIDAÇÃO DO CIP DO FERMENTADOR	74
4.1.1	Qualificação das instalações	74
4.1.2	Qualificação operacional	75
4.1.3	Qualificação do desempenho	79
4.1.3.1	Análise do ATP.....	79
4.1.3.2	Indicadores chave de desempenho KPIs do CIP	81
4.2	EXPERIMENTOS DO CIP EM LABORATÓRIO	84
5	CONCLUSÕES	91
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	93
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE A – Diagrama P&I do tanque fermentador na micro-cervejaria	102
	APÊNDICE B – Não conformidades do desenho higiênico no tanque fermentador	103

APÊNDICE C – Procedimento de higienização do tanque de fermentação	107
APÊNDICE D – Modelos de análise de regressão para os experimentos do CIP em laboratório	109
ANEXO A – Especificações do detergente alcalino Kalyclean C 272	110
ANEXO B – Especificações do detergente ácido Kalyclean A 691	111
ANEXO C – Procedimento para titulação (m/m) das soluções de limpeza.....	112

1 INTRODUÇÃO

Na produção de alimentos e bebidas o CIP (*Cleaning in Place*) é um processo muito importante, que tem um elevado impacto em três aspectos estratégicos de qualquer indústria: qualidade, ambiental e econômico.

Considerando o aspecto da qualidade, o CIP dentro do sistema produtivo tem um papel até essencial, pois se a limpeza for deficiente existem perigos microbiológicos¹ e químicos² que podem comprometer a qualidade e até a segurança do produto, tanto que no processamento de alimentos líquidos, a limpeza é um pré-requisito (SMIT, 2003).

No aspecto ambiental o CIP é relevante, pois o processo de limpeza é a maior fonte de resíduos em processos produtivos, empregando a maior quantidade de água e agentes químicos. Mas existem fatores tecnológicos no processo CIP que permite reduzir a quantidade de água usada, por exemplo, pode se recuperar água dos enxágues para reduzir água e trabalho requerido (CLARK, 2009).

No que tange ao aspecto econômico, o CIP é potencialmente o maior contribuinte dos custos variáveis no processo produtivo (BRIGGS et al., 2004), pois os custos dos recursos empregados e do tratamento de efluentes é elevado, além de que os depósitos minerais nos equipamentos reduzem a eficiência dos equipamento prejudicando o desempenho produtivo (WALSTRA et al., 1999). Atualmente, com o intuito de garantir uma boa limpeza e reduzir os perigos microbiológicos em muitos processos produtivos se empregam elevadas concentrações³, tempos de recirculação de soluções de limpeza e enxágue longos, temperaturas e forças mecânicas (turbulência) inadequadas, reduzindo a eficiência, isto é, incrementando o consumo desnecessário de soluções de limpeza, água, energia e tempo, produzindo mais poluição (soluções

¹ Crescimento de microorganismos não desejados que possam comprometer a saúde do consumidor (bactérias e fungos patogênicos) ou que possam alterar ou estragar as características do produto (bactérias acidificantes, mofos, leveduras, etc.).

² Contaminação do produto com soluções de limpeza: hidróxido de sódio, ácido nítrico, ácido per acético, etc.

³ Os fatores que permitem a limpeza são os denominados como as 4Ts: temperatura, tempo, turbulência (forças mecânicas) e titulação (forças químicas). Esses parâmetros são endógenos ao processo CIP, mas precisa-se levar em conta dois parâmetros exógenos adicionais que influenciam o CIP, que são a tecnologia, que contempla o desenho higiênico de equipamentos e instalações, e o treinamento do pessoal (LELIEVELD et al., 2005).

de limpeza). Tudo isso sem levar em conta que só uma adequada combinação ou harmonização desses fatores pode permitir uma limpeza eficaz e eficiente.

Especificamente na indústria cervejeira precisam-se desenvolver processos CIP eficientes e eficazes, pois o processo produtivo é muito sensível à contaminação microbiológica, sendo que esta acarreta na deterioração das características sensoriais da cerveja, por exemplo: odor e sabor desagradáveis, turvação, mudança do pH, entre outros. Isso produz perdas econômicas além de um efeito negativo na imagem da empresa se o produto chegasse ao consumidor. A cerveja é um produto que mundialmente tem tido uma tendência de crescimento anual (15,6%), pois a produção incrementou-se de 1,3 bilhões de hectolitros (hL) no ano 2000 até 1,95 bilhões de hL no ano 2012. O Brasil está entre os três maiores produtores do mundo⁴ com 132 milhões de hL no mesmo ano, o que representa o 7,4% da produção mundial. É importante observar que a taxa de crescimento da produção de cerveja do Brasil tem uma maior tendência. As perspectivas de crescimento para essa indústria são importantes no Brasil, pois para o ano 2016 espera-se que o setor produtivo de bebidas alcoólicas dentro do qual a cerveja é o principal, pois representa mais de 54%, atinja os 158.794,5 milhões de reais, um incremento de 34% se for comparado com os valores do ano 2012 (R\$ 118.533,4) e uma taxa constante de crescimento de 7,14% (SEBRAE, 2013).

O crescimento da indústria cervejeira foi motivado pelo incremento da demanda, pois o consumo de cerveja per capita anual no Brasil incrementou-se passando de 41,8 L em 1994 até 68,3 L no ano 2012, superando o consumo de vinho (1,26 L/ano), e chegando perto do consumo de refrigerantes (83 L/ano) (SINDICERV). Esse incremento no consumo sugere que o mercado de cervejas seja um mercado atrativo. Porém, o mercado cervejeiro caracteriza-se por ser muito concentrado (poucos concorrentes possuem a maior participação do mercado e muitos concorrentes com pouca participação do mercado), com um índice de Herfindahl-Hirschman⁵ (HHI) de 4800, e dentro desse mercado as micro-cervejarias representam aproximadamente 0,15%.

⁴ Em primeiro lugar está China com 490.200 milhões de hL e depois os Estados Unidos com 229.314 milhões de hL no ano 2012.

⁵ O índice Herfindahl-Hirschman, ou simplesmente índice Herfindahl, é uma medida estatística da concentração do mercado, o HHI contabiliza o número de empresas em um mercado, e a concentração incorporando o tamanho relativo (a participação de mercado) de todas as empresas em um mercado. A equação que

Para subsistir em um mercado com muita concorrência, as micro-cervejarias têm como objetivo ser competitivas, desenvolvendo processos eficientes e eficazes e oferecer produtos diferenciados com qualidade superior (STEFENON, 2012). Para isso, é preciso reduzir os perigos que possam afetar a qualidade da cerveja e aprimorar o uso dos recursos para reduzir os custos. A validação do processo CIP é uma das ferramentas que permitem conseguir esse objetivo.

define o índice HH é: $HHI = \sum_{i=1}^n (MS_i)^2$, onde MS_i representa a participação do mercado da empresa i , com n empresas no mercado (RHOADES, 2001).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Realizar a validação do processo CIP (*Cleaning in place*) em uma microcervejaria.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Empregar a metodologia proposta pela EHEDG (*European Hygienic Engineering Design Group*) para a validação do CIP de um fermentador;
- b) Avaliar as condições atuais dos fatores: tempo, temperatura, turbulência, titulação, tecnologia e treinamento do processo CIP;
- c) Propor melhorias no processo CIP atual, que permita um processo eficaz e eficiente do fermentador;
- d) Estabelecer a participação dos custos atuais dos insumos empregados no CIP do fermentador: químicos, água, energia e mão de obra.
- e) Estabelecer indicadores chave do desempenho para o consumo de produtos químicos, água e energia empregados no processo CIP.
- f) Realizar experimentos em laboratório para avaliar os fatores relevantes para a remoção do biofilme mediante um CIP.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA

Seja em uma grande cervejaria ou em uma micro-cervejaria, as diferentes fases do processo de produção de cerveja podem ser agrupadas nas seguintes etapas: produção/adequação do mosto, fermentação/maturação e engarrafamento. Não se considera o processo de malteação, pois atualmente poucas cervejarias produzem seu próprio malte e a maioria prefere comprar malte pronto para a produção de cerveja (KUNZE, 2006).

Dentro de cada etapa existem algumas operações que nem todas as empresas realizam especialmente as micro-cervejarias, pelos elevados custos dos equipamentos ou por ser uma característica do estilo de cerveja. Por exemplo, só algumas micro-cervejarias realizam a filtração (elevados custos dos equipamentos), clarificação com separadora centrífuga ou muitas não realizam a pasteurização da cerveja, pois produzem o *chopp* (BRASIL, 2009).

2.1.1 Produção e adequação do mosto

O objetivo da produção e adequação do mosto é obter o extrato do malte ou mosto com características adequadas, para na etapa de fermentação permitir o metabolismo da levedura e assim obter uma cerveja com as características desejadas. Para obter o mosto precisa-se a transformação das matérias primas em distintas operações que são: moagem, brassagem, clarificação, fervura, *whirlpool*, resfriamento e aeração/oxigenação.

2.1.1.1 Moagem

O objetivo da moagem é quebrar os grãos do malte para incrementar a área de contato do malte com água para facilitar a ação das enzimas, mas preservando as cascas, pois são necessárias na etapa de clarificação. A moagem pode ser seca, condicionada ou úmida, o processo mais comum é a moagem seca (BRIGGS, et al., 2004; KUNZE, 2006). Existem diferentes equipamentos para realizar a moagem, mas os mais empregados em micro-cervejarias são os moinhos

de dois rolos. O tamanho de partículas e a sua quantidade são fatores que vão determinar a quantidade de extrato obtido e a qualidade do mesmo.

2.1.1.2 Brassagem

O malte e os adjuntos são misturados com água quente para conseguir a hidrólise das proteínas e amido graças à ação de enzimas que foram desenvolvidas durante a malteação da cevada. A mistura é feita em um tanque chamado tanque de mosturação onde sob condições de calor e agitação, o amido vai se gelatinizar, isto é, os grãos de amido absorvem água, se incham e depois explodem liberando os constituintes amilose e amilopectina para depois permitir a ação das enzimas. As enzimas mais importantes são: as amilases que atuam no amido para produzir açúcares, e as proteases que decompõem as proteínas em compostos simples que são necessários para a atividade metabólica da levedura, para fornecer corpo à cerveja e estabilidade à espuma (KUNZE, 2006).

Os açúcares obtidos podem ser classificados como: açúcares fermentescíveis que constituem 63%-68% do mosto e açúcares não fermentescíveis. Os açúcares fermentescíveis estão compostos principalmente por maltose (65.5%), maltotriose (17.5%), sacarose (5%), glicose e frutose (12%), e os açúcares não fermentescíveis estão compostos por dextrinas que conferem corpo à cerveja (KUNZE, 2006).

Cada grupo de enzimas tem uma faixa de temperatura ótima para ação, por exemplo, proteases: 40-50 °C, amilases: 60-75 °C, e dependendo do tempo que o mosto ficar em uma determinada temperatura vai ser a quantidade da transformação enzimática e a quantidade dos produtos obtidos (HUI, 2007).

Se forem usados outros cereais que tiveram uma temperatura de gelatinização diferente do malte 60 °C como milho (60-70 °C), arroz (70-85 °C) e sorgo (68-75 °C), para que o amido contido neles possa ser hidrolisado pela ação das enzimas, primeiro deve ser gelatinizado. Por isso costuma-se cozinhar os adjuntos em outro tanque conhecido como tina de adjuntos, até garantir a gelatinização do amido contido neles. Depois se junta com o mosto principal para que as enzimas atuem (KUNZE, 2007).

Depois da ação adequada das enzimas, incrementa-se a temperatura para inativa-las, pois nos seguintes processos já não são necessárias. A inativação das mesmas permite fixar o teor de açúcares fermentescíveis.

2.1.1.3 Clarificação

Nessa etapa se separa o mosto do bagaço. O bagaço está constituído por grãos, cascas e partículas insolúveis. O elemento filtrante está constituído pelas cascas do malte ou bagaço que formam uma camada no fundo da tina de clarificação. No final dessa etapa é realizado o *sparging* que é um enxágue com água quente do bagaço para recolher a maior quantidade dos açúcares retidos no bagaço (KUNZE, 2006).

2.1.1.4 Fervura

A fervura consiste em aquecer o mosto límpido até temperaturas elevadas. Esse processo permite eliminar qualquer micro-organismo, evaporar compostos indesejáveis como o dimetil sulfeto ou DMS⁶, coagulação do excesso de proteínas e taninos, formação de compostos de aroma e melanoidinas⁷ e concentração do mosto. Também na etapa de fervura é adicionado o lúpulo (de amargor e aroma), pois é durante a fervura que se produz a isomerização dos componentes α -ácidos do lúpulo e a solubilização de outras substâncias que conferem sabor e aroma à cerveja (BUCKEE; BARRETT, 1982; J. KUNZE, 2006; HUI, 2007).

2.1.1.5 *Whirlpool*

Esse processo permite obter um mostro límpido, pois são separadas as proteínas e polifenóis oxidados e insolúveis no mosto quente. O material separado se chama *trub* quente ou *hot break*. Para favorecer a separação o mosto é ingressado tangencialmente com elevadas velocidades para permitir que a separação seja feita por efeitos das forças centrípetas e centrífugas (PRIEST; STEWART, 2006; KUNZE, 2007; HUI, 2007). Além do método do *whirlpool* são usadas

⁶ Durante a malteação forma-se S-methylmethionina SMM, que é o precursor do dimetil sulfeto DMS. Em elevadas temperaturas, na torrefação do malte, na brassagem e na fervura, o SMM forma DMS. A presença do DMS fornece gosto à cerveja de vegetais cozidos (HUI, 2007).

⁷ As melanoidinas ou compostos que fornecem cor, são o resultado da reação de Maillard, isto é, da interação entre os aminoácidos com açúcares redutores sacarídeos em temperaturas elevadas de 100 °C (HUI, 2007).

centrífugas para separar o *trub*, porém, por seu elevado custo são empregadas quase exclusivamente em empresas de grande porte.

2.1.1.6 Resfriamento/Areação

Nessa etapa reduz-se a temperatura até um nível adequado para a levedura e adiciona-se oxigênio ou ar necessário para processos de biossínteses da membrana celular (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003). O processo de resfriamento deve ser o mais rápido possível (BRIGGS, et al., 2004).

2.1.2 Fermentação e maturação

Nessa etapa adicionam-se as leveduras para obter álcool dos açúcares, e depois a levedura é retirada e a cerveja é mantida no tanque para melhorar as características de sabor e aroma, ou *flavors*.

2.1.2.1 Adição de levedura

O tipo de levedura depende do tipo de cerveja, podendo ser nova ou pode ser produto de outras fermentações. É importante realizar a manipulação da levedura com muito cuidado para evitar contaminações microbiológicas durante sua hidratação ou preparação, e deve ser adicionada ao mosto em linha ou no fermentador o mais rápido possível, para favorecer seu crescimento e reduzir perigos de desenvolvimento de outros micro-organismos no mosto (KUNZE, 2006).

2.1.2.2 Fermentação

A levedura se multiplica usando as proteínas e metabolizando os açúcares contidos no mosto, convertendo-os em álcool, dióxido de carbono e outros subprodutos que conferem *flavors* à cerveja. O tempo e as condições térmicas do processo dependerão do tipo de levedura, onde para as de baixa fermentação são utilizadas temperaturas entre 8-13 °C e 10 dias, enquanto que para leveduras de alta fermentação temperaturas entre 14-17 °C e 72 horas (BRIGGS, et al., 2004).

2.1.2.3 Maturação

O objetivo da maturação é melhorar as características do sabor e aroma. Esta etapa é feita em temperatura baixa 0°C para promover a sedimentação das leveduras, proteínas e polifenóis e assim poder retirar esses compostos e obter uma cerveja clara. A duração da maturação depende do estilo de cerveja.

2.1.2.4 Enchimento e pasteurização

As micro-cervejarias fornecem seu produto principalmente em garrafas de vidro e barris (alumínio e aço inoxidável), poucas microcervejarias enchem em latas de alumínio. O processo de enchimento pode ser manual ou automático. As garrafas e barris devem ser limpos antes do enchimento, e o processo de limpeza pode ser manual ou automático, onde se usam soluções de limpeza cáusticas e ácidas.

Depois do enchimento e fechamento, as garrafas de cerveja são pasteurizadas, para isso elas são submersas em água quente durante um curto período de tempo para depois serem resfriadas. Esse processo não é aplicado no *chopp*, pois a legislação brasileira define-o como cerveja não pasteurizada (BRASIL, 2009).

Depois da pasteurização as garrafas são etiquetadas e armazenadas prontas para a venda ou distribuição.

2.2 QUALIDADE DA CERVEJA

A qualidade de uma cerveja pode ser definida pelo conjunto de características organolépticas próprias de um estilo, isto é, sabor, aroma, cor, turvação e espuma. Se todas essas características estão de acordo com o esperado, então pode ser considerada como uma cerveja de qualidade. Porém, a cerveja é um produto muito sensível, depois de engarrafada já experimenta mudanças nas suas características (ainda que sejam mudanças pequenas). Fatores como luz, temperatura e agitação, podem prejudicar a estabilidade de uma cerveja (PRIEST; STEWART, 2006). Essas mudanças são próprias da cerveja, mas existe o perigo de que as alterações ou variações na qualidade sejam devidas a falhas no processo de produção, como devido à contaminação química ou microbiológica, reações enzimáticas incompletas e oxidação do mosto. Na continuação se descreve as principais características organolépticas desejáveis em uma cerveja.

2.2.1 Cor e turvação

Normalmente uma cerveja não deve apresentar turvação, mas existem cervejas encorpadas que tem uma turvação própria do estilo, como a cerveja tipo *Weiss*. A turvação pode ser reversível ou irreversível. Se uma cerveja for armazenada em baixas temperaturas (0°C) vai se formar uma turvação devido à associação de pequenos polifenóis polimerizados e proteínas, porém, na medida em que a temperatura subir a “névoa” vai desaparecer. Ao contrário, se a cerveja for armazenada em temperatura ambiente por períodos muito longos ou se experimentar flutuações térmicas (quente-frio) pode-se formar turvação irreversível ou “névoa” que não irá desaparecer (PRIEST; STEWART, 2006).

2.2.2 Sabor

Todo estilo de cerveja tem um perfil sensorial, entre os compostos que conferem sabores específicos estão: compostos carbonilados, compostos sulfurados e aldeídos. Se algum ou vários deles estiver fora dos parâmetros do estilo, vão se desenvolver sabores desagradáveis ou fora do estilo como, por exemplo, papelão, rançoso e azedo. Mas, quem mais deteriora o sabor é oxigênio e por isso tenta-se reduzi-lo (KUNZE, 2006).

2.2.3 Espuma

Uma característica da cerveja é o colarinho de espuma no copo, não só pela questão estética, mas também pelo fato de que reduz a oxidação da cerveja, pois forma uma camada que separa a superfície da cerveja do ar ambiente. Porém, o uso de adjuntos que diminuem o corpo da cerveja tem um impacto negativo na formação de espuma (KUNZE, 2006).

2.3 O PROCESSO DE LIMPEZA

O processo de limpeza é um conjunto de atividades que tem como objetivo principal eliminar a sujeira ou depósitos que podem ter se formado ou acumulado nas superfícies dos equipamentos e tubulações

durante o processo produtivo. É importante a remoção desses resíduos, pois se ficarem podem produzir contaminações no produto e pôr em risco a saúde do consumidor ou produzir alterações indesejáveis no produto. Além disso, reduzem a eficiência dos equipamentos, pois esses depósitos formam camadas isolantes que reduzem a transferência de calor.

Dependendo do processo de produção e o produto processado, a sujeira a ser retirada vai ser diferente e as características do processo de limpeza precisam estar em concordância com isso para poder garantir uma boa limpeza (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005). O presente estudo foca-se nos resíduos gerados no processo de produção de cerveja, mas muitos deles podem ser encontrados em outros processos produtivos, em diferentes quantidades. Os depósitos ou sujeira podem ser classificados em três tipos principais: orgânicos, minerais ou inorgânicos e biológicos.

2.3.1 Depósitos orgânicos

Os depósitos orgânicos são resíduos de origem animal ou vegetal, constituídos principalmente por proteínas, carboidratos, gorduras e óleos. Alguns deles são insolúveis em água e o principal problema com este tipo de resíduos é que se forem submetidos a processos térmicos muito intensos (por exemplo: pasteurizadores e fornos) formam-se resíduos carbonizados muito difíceis de remover e também constituem o substrato no qual podem se desenvolver microrganismos (TAMIME, 2008).

No processo da produção da cerveja a quantidade de cada um desses elementos varia dependendo das características desejadas no mosto. Por exemplo, produzir um mosto com baixo teor de proteínas e maior quantidade de açúcares fermentescíveis, baixo teor de açúcares fermentescíveis e alto teor de açúcares não fermentescíveis, etc.

2.3.1.1 Carboidratos

Os carboidratos compõem 90-92% do total de sólidos dissolvidos no mosto e a maioria estão na forma de açúcares solúveis em água devido à ação das enzimas que transformaram o amido em açúcares mais simples, principalmente na forma de açúcares fermentescíveis e não fermentescíveis (BOULTON, 2000). Do ponto de vista da limpeza,

os açúcares solúveis em água são facilmente eliminados (TAMIME, 2008).

2.3.1.2 Compostos nitrogenados e lipídeos

Os compostos nitrogenados representam entre 4-5% do total de sólidos dissolvidos no mosto, sendo a maioria solúvel em água pela ação das enzimas (proteases) e os insolúveis retirados com o *trub*. As proteínas vêm do malte, adjuntos e em menor quantidade do lúpulo (KUNZE, 2006). Os lipídeos provêm principalmente do malte e adjuntos, são insolúveis e formam uma emulsão que fica suspensa no mosto (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003).

2.3.2 Depósitos inorgânicos

Principalmente resultante da dureza da água, a dureza está formada por sais de cálcio e magnésio dissolvidos, sendo expressa em termos de carbonato de cálcio equivalente (TAMIME, 2008). Quando água que contém carbonatos dissolvidos é aquecida a temperaturas entre 70-80 °C acontece uma reação na qual os carbonatos são convertidos em carbonato de cálcio insolúvel que precipita na forma de calcário nas paredes do recipiente (KUNZE: 2006). Além disso, em qualquer superfície (tanques, tubulações, dispensadores, etc.) em contato com a cerveja, vai se formar a “pedra cervejeira” que são depósitos de oxalato de cálcio insolúvel, produto da reação do oxalato (presente nos grãos de malte e adjuntos) com o cálcio (BOULTON, 2000; JACQUES et al., 2003). Os depósitos minerais se não forem retirados podem formar uma camada grossa que reduz a eficiência dos equipamentos, pois reduz a transferência de calor.

2.3.3 Depósitos microbiológicos

Na produção de alimentos a formação de depósitos microbiológicos é um perigo que precisa de muita atenção, pois eles ou os subprodutos produzidos por eles podem representar um perigo para a saúde do consumidor ou podem alterar ou deteriorar as características dos alimentos (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005).

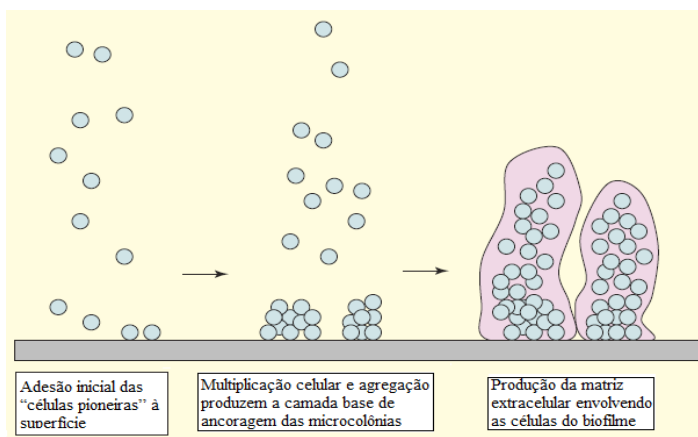
Os micro-organismos dificilmente podem ser achados livres, pois pelo menos 99% das bactérias do planeta vivem na forma de biofilmes (Figura 2.1). O biofilme é uma população de micro-organismos

protegidos por uma matriz extracelular polimérica (NOBILE; MITCHELL, 2007).

A formação do biofilme envolve fatores químicos e biológicos. A formação do biofilme começa com a adesão reversível de microrganismos planctônicos à superfície, mediante forças de van Der Waals e eletrostáticas, depois se torna uma adesão irreversível mediante a produção de exopolissacarídeo (EPS), o EPS forma uma matriz que mantém aderidos os microrganismos entre si e com a superfície, produz-se o desenvolvimento de micro colônias dentro do biofilme, finalmente com um biofilme maduro produzem-se flocos ou grupos de bactérias que se desprendem para formar novas colônias (MYSZKA; CZACZYK, 2011).

Essas comunidades de microrganismos podem ser de uma espécie só ou podem ser uma mistura de diferentes espécies (BOULTON, QUAIN: 2001; NOBILE; MITCHELL, 2007) que estabelecem uma estratégia de cooperação ou consorcio onde uma espécie permite o desenvolvimento da outra, geralmente o microrganismo que tem a capacidade de formar maior quantidade de EPS acolhe a outra, e esses biofilmes multi - espécie são mais estáveis e maiores do que os de uma espécie só (KUMAR; ANAND, 1998).

Figura 2.1. Formação do biofilme (adaptado de Nobile e Mitchell, 2007)



Os fatores que afetam a adesão do biofilme são: acabamento superficial da superfície, propriedades de hidrofobicidade e

hidrofilicidade, a biosíntese dos EPS, pH, disponibilidade de nutrientes, temperatura (MYSZKA; CZACZYK, 2011).

A remoção completa dos biofilmes antes da desinfecção ou sanitização é importante, pois a desinfecção/sanitização pode ser ineficaz, isso devido a que o biofilme incrementa dramaticamente a resistência dos micro-organismos dentro dele. Por exemplo, bactérias dentro do biofilme podem resistir ao vapor saturado com temperaturas de 121°C durante 30 minutos (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005).

Ao contrário de outros produtos, a cerveja não é propícia para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos devido à presença de álcool, pH baixo, ação bacteriostática dos iso- α -ácidos do lúpulo, nível nutricional relativamente baixo (baixo só depois do que a levedura metabolizou os açúcares em álcool), e a presença do dióxido de carbono (BRIGGS et al., 2000; BOULTON, QUAIN, 2001). Porém, a cerveja e principalmente o mosto, pode ser contaminado com micro-organismos deteriorantes como bactérias e leveduras selvagens que podem acarretar problemas na qualidade. Os Quadros 2.1 e 2.2 mostram um resumo das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas que podem ser encontradas na cerveja ou mosto, e os principais efeitos que podem produzir na cerveja.

Do grupo das bactérias Gram-negativas, as que precisam maior precaução são as do gênero *Obesumbacterium*, pois são determinantes na formação das N-nitrosaminas (BRIGGS et al., 2000).

As nitrosaminas são carcinogênicas de sistemas celulares de animais, elas podem ser nitrosaminas voláteis e não voláteis. As nitrosaminas não voláteis (ATNC ou total aparente de compostos N-nitrosos) são produto da reação das aminas do mosto com nitritos. Os nitritos vêm da redução química dos nitratos pela ação das bactérias principalmente as *Obesumbacterium proteus*. Os nitratos sempre existem no mosto proveniente da água, malte, lúpulo. Para reduzir ou eliminar as nitrosaminas voláteis precisa-se de um apropriado processo de secagem e torrefação do malte. Para eliminar os ATNC precisa-se de uma adequada manipulação e higiene na cervejaria, (BRIGGS et al., 2000; BOULTON, QUAIN, 2001).

Quadro 2.1. Bactérias Gram-negativas deteriorantes da cerveja (Boulton e Quain, 2001).

Família	Gênero	Principais características
Acéticas	<i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i>	Específica de ambientes aeróbios ou micro-aeróbios como dispensadores ou pontos de extração da cerveja (sem pasteurizar), mas não em barris. Forma turvação e filme superficial com muita viscosidade, “grudento”.
	<i>Obesumbacterium</i> (<i>Hafnia</i>)	Geralmente limitados ao mosto e no início da fermentação, produz subprodutos sulfurosos (DMS), reduz a velocidade de fermentação e produzindo maior pH, reduz o nitrato para nitrito favorecendo a formação de ATNCs.
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	Contaminante ocasional do mosto, pode acelerar a fermentação, produz ácidos orgânicos e DMS, mas não consegue sobreviver à fermentação.
	<i>Enterobacter</i> (<i>Rahnella</i>)	Geralmente limitados ao mosto e no início da fermentação, produz subprodutos sulfurosos (DMS) e diacetil, incrementa a velocidade inicial de fermentação, com pH final maior.
	<i>Klebsiella</i>	Forma <i>off-flavors</i> fenólicos (4-vinyl guaiacol) e DMS.
	<i>Zymomonas</i>	É específica da alta fermentação e cervejas com adição de <i>priming</i> de glicose, produz <i>off-flavors</i> incluindo sulfeto de hidrogênio e acetaldeído.
	<i>Pectinatus</i>	Pela sua sensibilidade ao oxigênio estão restritos a condições de baixo oxigênio no processo ou envase. <i>Off-flavors</i> como sulfeto de hidrogênio e outros compostos do enxofre, acetaldeídos, ácidos propriônicos e outros ácidos fracos. Desenvolve-se melhor em pH elevados (4,5-6) com crescimento enfraquecido em pH de 3,7-4.
	<i>Megasphaera</i>	Pela sua sensibilidade ao oxigênio está restrita a condições de baixo oxigênio no processo ou envase, <i>off-flavors</i> sulfeto de hidrogênio (descritos como aroma sujo, podre ou fezes) e outros compostos do enxofre, acetaldeídos, ácidos propriônicos e outros ácidos fracos, desenvolve-se melhor em pH elevados (4,5-6) com crescimento enfraquecido em pH 3,7-4.

Quadro 2.2. Bactérias Gram-positivas deteriorantes da cerveja (Boulton e Quain, 2001).

Família	Gênero	Principais características
Bactérias ácido lácticas	<i>Lactobacillus</i>	Poderoso deteriorante da cerveja, crescimento ótimo em pH 4-5, forma turvação, acidez, viscosidade, diacetil, resistência variável aos iso- α -ácidos
	<i>Pediococcus</i>	Resistem aos iso- α -ácidos e ao etanol (<10%, v/v), produz diacetil acidez e turvação (névoa)
	<i>Bacillus (B. coagulans)</i>	Sensíveis a os iso- α -ácidos, não deterioram a cerveja, podem ser achadas no mosto quente, formam ácido láctico em temperaturas 55-70 °C, implicada na formação de ATNCs no mosto doce.
	<i>Micrococcus</i>	Amplamente encontrados em cervejarias, pode sobreviver na cerveja, mas poucas vezes estraga o produto, ainda que a <i>M. kristinae</i> tem produzido aromas frutados com elevado pH e baixo amargor.

Segundo Briggs et al. (2000) uma levedura selvagem é qualquer levedura diferente a aquela que seja adicionada deliberadamente e sob condições controladas ao mosto. Por exemplo, leveduras endêmicas do ambiente ou das matérias primas, leveduras de outras fermentações que ficaram no tanque e não foram adicionadas deliberadamente ou uma levedura tipo ale em um processo lager. O Quadro 2.3 mostra as principais leveduras de gênero diferente ao gênero *Saccharomyces*, e os defeitos que elas podem produzir na cerveja.

O Quadro 2.4 mostra um resumo dos principais tipos de sujeiras que podem se apresentar no processo de produção da cerveja, ainda que não apareçam explicitamente os biofilmes, precisa-se levar em conta que existe o perigo de contaminação microbiológica em todo o processo se não forem aplicadas boas práticas de fabricação.

Quadro 2.3. Leveduras selvagens (Boulton e Quain, 2001).

Gênero	Principais características
<i>Brettanomyces</i>	Notável por causar <i>off-flavors</i> em cervejas engarrafadas, supera à <i>Saccharomyces</i> na fermentação espontânea do mosto (cervejas tipo lambic e gueuze).
<i>Candida</i>	Infecção limitada à fase inicial aeróbia da fermentação ou cervejas extraídas sem pasteurizar, algumas cepas podem crescer em ambientes micro-aeróbios.
<i>Cryptococcus</i>	Pode ser achada em cerveja no processo ou na embalagem (garrafa, latas, etc.) pode sobreviver, mas não estraga a cerveja.
<i>Dekkera</i>	Deteriorante da cerveja extraída sem pasteurizar.
<i>Kluyveromyces</i>	Deteriorante de refrigerantes, sucos de frutas e produtos com elevados teores de açúcar, é um contaminante comum de laticínios.
<i>Pichia</i>	Infecção limitada à fase inicial aeróbia da fermentação, pode estragar pontos de extração de cerveja não pasteurizada, forma turvação (névoa) e biofilmes. A <i>P. membranifaciens</i> produz um sabor de chucrute.
<i>Rhodotorula</i>	Transmitida pela água, pode ser achada em leveduras que foram inoculadas, pode sobreviver na cerveja, mas não a estraga.
<i>Torulaspora</i>	Contaminante de leveduras durante a inoculação, pode estragar cerveja sem pasteurizar em pontos de extração, tem a capacidade de crescimento em ambientes micro-anaeróbios.
<i>Zygosaccharomyces</i>	Microrganismo deteriorante de refrigerantes, sucos de fruta e produtos com alto teor de açúcar.

Quadro 2.4. Composição da sujeira na produção de cerveja (Boulton e Quain, 2001).

Localização	Composição da sujeira
Brassagem	Proteína, amido, minerais, pedra cervejeira, resíduos do lúpulo, açúcares fermentescíveis.
Resfriamento do mosto	Proteína, amido, minerais, pedra cervejeira, resíduos do lúpulo, açúcares fermentescíveis.
Fermentação	Proteína, açúcares não fermentescíveis, minerais, pedra cervejeira, levedura, especialmente no topo dos tanques.
Maturação	Proteína, açúcares não fermentescíveis, minerais, pedra cervejeira, levedura.
Engarrafamento/enchimento	Pedra cervejeira, componentes da espuma.

2.4 LIMPEZA FORA DO LOCAL COP (CLEANING OUT OF PLACE)

O processo de limpeza fora do local ou COP (*Cleaning out place*) consiste em realizar a remoção da sujeira dos equipamentos basicamente com trabalho braçal, pois no COP os equipamentos são desmontados e as partes são limpas usando água, detergentes fracos e trabalho braçal (HUI, 2006). O COP pode ser feito de muitas formas, empregando diferentes metodologias, por exemplo, com escova, lavadoras de alta pressão, enchimento com soluções de limpeza e agitação (HELDMAN e LUND, 2007; TAMIME, 2008).

2.4.1 Etapas do COP

Segundo Lelieveld, Mostert e Holah (2005) o COP consiste em cinco operações que são: pre-enxágue, limpeza, enxágue, sanitização ou desinfecção e enxágue final. Porém, outros autores deixam fora a sanitização ou desinfecção do processo de limpeza (WALSTRA et al., 1999; JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003; KUNZE, 2006; TAMIME, 2008).

O COP tem limitações principalmente relacionadas com a variabilidade da eficácia da limpeza e com a seguridade do pessoal. A variabilidade vem devido ao fator humano, pois não podem se atingir todos os lugares com a mesma intensidade. Para garantir a seguridade do pessoal, a seleção do tipo de detergente, as concentrações e temperaturas das soluções de limpeza devem ser baixas para poder ser usadas diretamente pelo pessoal que faz a limpeza. Também existem equipamentos ou instalações nas quais não pode ser aplicado o COP, por exemplo, tubulações muito compridas e espaços que não permitem o uso de equipamentos para limpeza (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005; TAMIME, 2008).

Embora o COP tenha limitações, existem equipamentos ou componentes de equipamentos que só podem ser limpos mediante o COP, por exemplo, as gaxetas das escotilhas em tanques, o exterior de tanques e equipamentos, válvulas de tomada de amostras, separadores ou desnatadeiras que não são autolimpantes, etc. Nesses casos são necessários procedimentos operacionais padronizados (POP) para reduzir a variabilidade dos resultados.

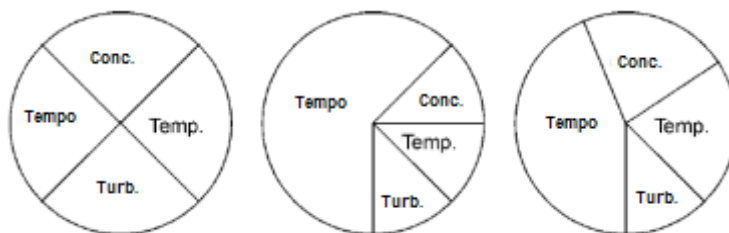
2.5 LIMPEZA NO LOCAL CIP (CLEANING IN PLACE)

Devido às limitações e perigos para a seguridade do pessoal que tem o COP, foi desenvolvida uma alternativa para realizar o processo de limpeza de equipamentos e tubulações. Segundo Clark (2009), o CIP foi desenvolvido originalmente para a indústria de laticínios e depois, devido às vantagens obtidas, se espalhou seu uso para outros processos produtivos.

Segundo Tamime (2008) o CIP é a limpeza de todos os componentes da planta ou circuitos de tubulações sem desmontar ou abrir os equipamentos e com pouco ou nenhuma intervenção do operador. O processo envolve o espalhamento nas superfícies ou a circulação das soluções de limpeza sob condições de elevada turbulência e velocidade de fluxo.

Existem fatores ou parâmetros que combinados adequadamente permitem a remoção eficaz dos resíduos em tubulações e equipamentos. Os parâmetros são conhecidos como os 4Ts: temperatura, tempo, titulação e turbulência. Esses 4Ts não dependem das instalações ou da operação/pessoal, porém, para garantir um processo eficaz de limpeza se requer também a incorporação de mais dois fatores relacionados com o pessoal e as instalações, que são: treinamento e tecnologia (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003; LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005; HELDMAN e LUND, 2007; TAMIME, 2008).

Figura 2.2. O círculo de Sinner e inter-relação dos parâmetros de limpeza (adaptado de Lelieveld; Mostert e Holah, 2005).



A influência dos quatro fatores: temperatura, turbulência, titulação (concentração) e tempo foi estabelecida por Sinner em 1960, e estabelece que se um dos quatro fatores for mudado, precisa-se compensar com os outros fatores para obter os mesmos resultados, isto é, precisa-se a harmonização das 4Ts. A interação entre os quatro fatores

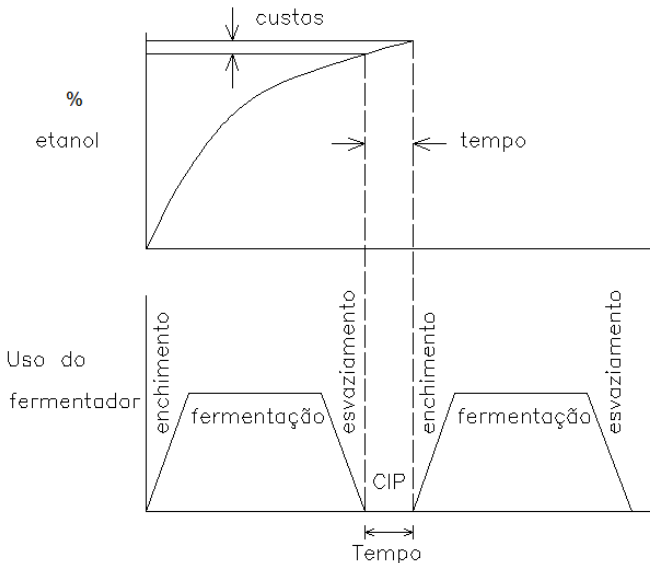
é representada no círculo de Sinner (Figura 2.2) (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005).

2.5.1 Primeiro T: Tempo

O tempo refere-se à duração das distintas etapas do CIP e a frequência com que é feita a limpeza. O tempo precisa ser o suficiente para permitir as reações das soluções, a dissolução e remoção da sujeira. Deve incluir todas as fases do processo de limpeza até obter uma superfície completamente livre de qualquer tipo de resíduos e das mesmas soluções de limpeza (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005).

A Figura 2.3 mostra que incrementar o tempo de limpeza não é uma escolha simples como pode se acreditar, pois os recursos empregados na limpeza como tempo, pessoal, equipamentos, etc., poderiam ter sido empregados para produzir mais produto, ou seja, cerveja (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003).

Figura 2.3. Dilema da escolha entre tempo de limpeza e tempo de produção (adaptado de Jacques, Lyons e Kelsall, 2003).

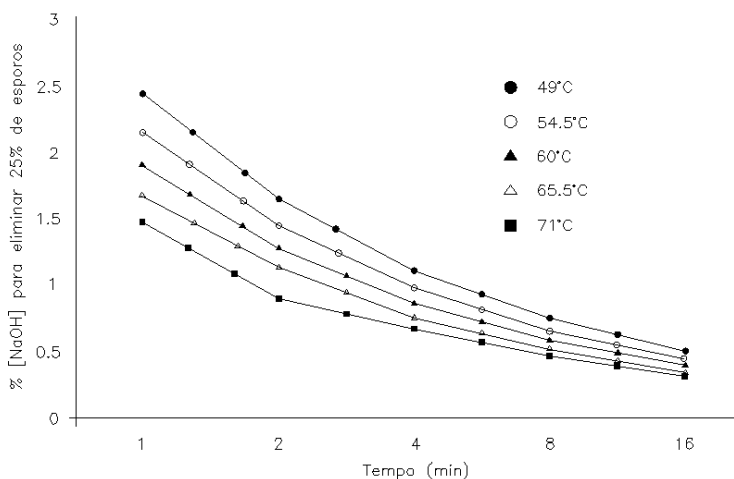


2.5.2 Segundo T: Temperatura

Maiores temperaturas melhoram o processo de limpeza, pois reduzem a tensão superficial e a viscosidade (TAMIME, 2008). Também permitem uma maior solubilidade da sujeira na água, e as velocidades de reação são maiores, e isso implica que a ação dos detergentes sobre a sujeira possa ser mais rápida e mais efetiva (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003). Porém, a eleição da temperatura precisa ser definida levando em conta que podem acontecer mudanças na estrutura dos resíduos se a temperatura for muito elevada, por ex., a desnaturação de proteínas acontece em temperaturas acima de 85 °C, isso ao invés de facilitar vai dificultar a limpeza, também podem acontecer mudanças nas propriedades dos detergentes especificamente na estabilidade física, podendo chegar a formar precipitados ou filmes (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005).

A Figura 2.4 mostra o impacto favorável que existe entre o uso de soluções de limpeza aquecidas e a redução da concentração requerida nas mesmas para conseguir uma redução de 25% da população de esporos de *Bacillus subtilis*. Quanto maior for a temperatura empregada menor é a concentração e o tempo requerido para obter o mesmo impacto na redução da carga microbiana.

Figura 2.4. Impacto da temperatura na concentração do NaOH (adaptado de Boulton e Quain, 2001).



Existem, porém, condições nas quais pode ou deve ser aplicado um CIP em baixas temperaturas. Por exemplo, em produtos livres de gordura (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005) ou tanques com sistemas de resfriamento que não permite temperaturas elevadas, geralmente esse é o caso dos tanques de fermentação e maturação.

2.5.3 Terceiro T: Titulação

Refere-se à concentração das soluções químicas escolhidas para o processo de limpeza. As soluções de limpeza são chamadas detergentes, e esses detergentes precisam ter características para permitir uma boa limpeza. As principais características desejadas são: ter a capacidade de dissolver (decompor a sujeira em pedaços menores) ou solubilizar os depósitos; ter a capacidade de molhar e penetrar fácil e rapidamente as superfícies e as distintas camadas da sujeira; ter a capacidade de levar os resíduos suspensos na solução sem se depositar novamente; e ser fácil de enxaguar (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005; TAMIME, 2008).

A capacidade de solubilizar ou dissolver os depósitos está relacionado com o tipo de sujeira. Existem dois grandes grupos de detergentes, os ácidos e os alcalinos, e cada um deles pode remover um tipo específico de depósito. Isso se pode observar no Quadro 2.5 que resume as características da sujeira e o detergente químico apropriado para removê-la.

Quadro 2.5. Natureza da sujeira (adaptado de Tamime, 2008).

Afinidade da sujeira com água	Tipo de sujeira	Exemplo
Solúveis em água		Açúcares simples, proteínas solúveis em água.
Insolúveis em água	Solúveis em álcali	Proteínas, gorduras
	Solúveis em ácido	Depósitos minerais
	Insolúveis em álcali e ácido	Depósitos de carbono, resíduos fibrosos.
	Solúveis em solventes orgânicos	Óleos minerais

2.5.3.1 Detergentes alcalinos

São todos os compostos que incrementam o número de íons hidróxido OH^- , isto é, incrementam o pH da água acima do valor normal (pH 7). Comumente são usados hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, mas esses hidróxidos corroem alguns materiais como alumínio, zinco e cobre, por isso prefere-se o uso de aço inoxidável em equipamentos e tubulações. Também existem outros hidróxidos como compostos silicato alcalinos que não corroem esses metais (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003; TAMIME, 2008).

O incremento dos íons hidróxido permite a remoção dos resíduos devido a dois efeitos principais, descritos a seguir.

2.5.3.1.1 Peptização⁸

É o rompimento das proteínas, em que devido à reação com o hidróxido, os enlaces entre os aminoácidos podem ser hidrolisados ou rompidos, fazendo com que as proteínas menores e muito mais solúveis possam ser removidas. Proteínas compostas de aminoácidos são efetivamente limpadas por um álcali. Se o álcali for forte o suficiente, carboidratos também podem ser convertidos em íons negativos promovendo a sua remoção mais fácil (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003).

2.5.3.1.2 Saponificação

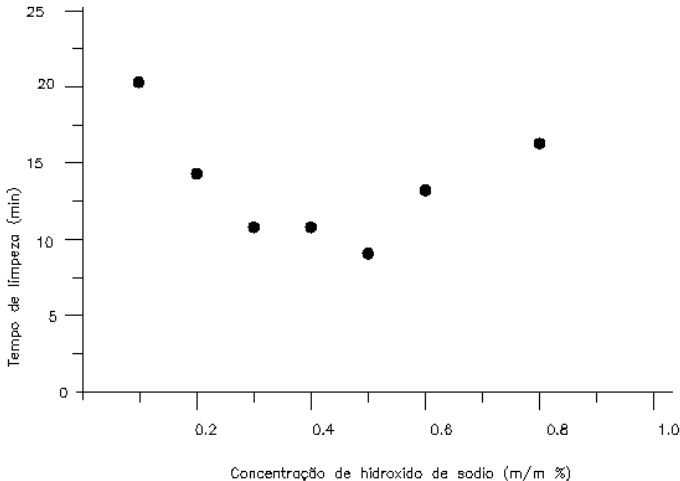
A Saponificação é a hidrólise dos triacil-gliceróis em ácidos graxos e gliceróis. Essa reação é produzida por um álcali em óleos e gorduras, o álcali vai decompor esses componentes em seus constituintes básicos glicerol e ácidos graxos livres; isso é a base para a formação de sabão a partir de gordura e álcali. Assumindo que não estão presentes íons de dureza para precipitar, e que o elevado pH mantém os ácidos graxos na forma ionizada, óleos e gorduras são removidos facilmente (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003; HUI, 2006).

⁸ Os componentes ácidos das proteínas podem perder seu hidrogênio ácido (H^+) pela neutralização com hidróxido (OH^-). Então, os compostos são convertidos em sua forma iônica carregada negativamente, onde os íons negativos repelem-se um do outro permitindo o rompimento dos agregados maiores dos resíduos em menores. Os íons negativos são também mais solúveis em água facilitando sua remoção da superfície (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003).

É importante lembrar que a soda cáustica não é por si mesma um sanitizante, ainda que, é um meio com pH elevado, bactérias podem ser achadas em elevados números em soluções cáusticas a temperatura ambiente. Porém, se a soda for aquecida até pelo menos 44°C se obtém um bom efeito sanitizante, mas o efeito depende do tempo, concentração e temperatura (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003).

A relação que existe entre a concentração das soluções alcalinas e a duração da limpeza pode ser observada na Figura 2.5, que mostra o tempo necessário para conseguir a limpeza de resíduos de proteína de soro de leite em uma temperatura de 50°C e uma velocidade de 0,175 m/s. Pode se observar que quanto maior for a concentração menor será o tempo requerido para obter uma limpeza completa, porém, além de um limite perde-se esse efeito favorável e acontece o efeito contrário. Isto é, o tempo requerido para obter a limpeza é maior, isso sugere que existe uma concentração ótima para obter uma boa limpeza com uma concentração apropriada.

Figura 2.5. Efeito da concentração de NaOH no tempo de limpeza (adaptado de Fryer; Hasting e Jeurnink, 1996).



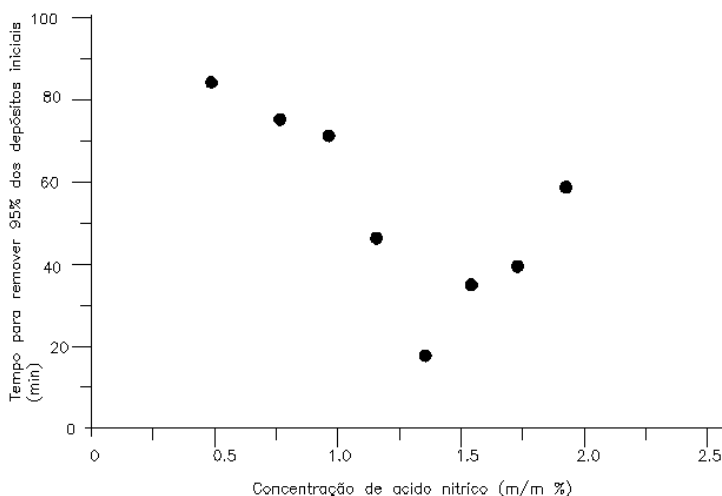
2.5.3.2 Detergentes ácidos

Detergentes ácidos permitem a remoção de depósitos inorgânicos, pois solubilizam compostos que precipitaram. Compostos de cálcio não

dissolvem bem em álcalis, mais são muito solúveis em ácidos. Usam-se ácidos inorgânicos, comumente ácido fosfórico e ácido nítrico, ou uma mistura deles, mas ocasionalmente também é usado ácido sulfônico. A limpeza com ácido pode seguir depois de uma limpeza inicial com um detergente alcalino (que remove os componentes orgânicos da sujeira) e o ácido é usado então para remover os resíduos inorgânicos (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003; TAMIME, 2008).

A relação que existe entre a concentração das soluções ácidas e a duração da limpeza pode ser observada na Figura 2.6, que mostra o tempo necessário para conseguir a limpeza de resíduos de amido em uma temperatura de 50 °C. Pode se observar que quanto maior for a concentração menor será o tempo requerido para conseguir uma redução do 95% dos depósitos iniciais, porém, além de um limite perde-se esse efeito favorável e acontece o efeito contrário, isto é, a redução dos depósitos é menor e portanto o a limpeza é menor. Isso, da mesma maneira que corre para os cáusticos, sugere que existe uma concentração ótima para obter uma boa limpeza com uma concentração de ácido apropriada.

Figura 2.6. Efeito da concentração de HNO_3 no tempo de limpeza de amido (adaptado de Fryer; Hasting e Jeurnink, 1996).



O detergente também precisa ter a capacidade para molhar e se espalhar facilmente na superfície com a qual esteja em contato. Para

melhorar essas características existem aditivos como surfactantes, tensoativos e sequestrantes ou quelantes, que permitem melhorar a eficiência dos detergentes.

2.5.3.3 Aditivos surfactantes

As moléculas dos surfactantes ou agentes sintéticos ativadores de superfície têm dois grupos diferentes na mesma molécula, um grupo hidrofílico que permite sua solubilidade na água e outro hidrofóbico, que procura outras substâncias diferentes à água nas quais é solúvel para se dissolver. Essas substâncias nas quais são solúveis são oleosas ou baseadas em gorduras. Os surfactantes favorecem a dispersão física, emulsão, penetração e hidratação dos resíduos, pois quando uma solução aquosa de um surfactante entra em contacto com uma superfície ou camada oleosa, o grupo hidrofóbico da molécula dissolve-se no óleo, o surfactante tira esse óleo da superfície e, usando o grupo hidrofílico, faz solúvel em água. Os surfactantes podem também se juntar na interfase entre a água e pequenas partículas de sujeira para formar uma esfera estável ao redor da partícula e mantê-la em suspensão permitindo que seja eficientemente removida longe da superfície (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003; LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005).

O surfactante mais antigo usado para limpeza é o sabão. As desvantagens do sabão é que reage com íons de cálcio e magnésio (íons da dureza da água) e forma sais insolúveis que precipitam na forma de escória que é difícil de remover, outra desvantagem é que só permanece solúvel se o pH for alto (alcalino). Se o pH for diminuído, isto é, se for misturado com soluções ácidas e neutralizado, o sabão perde a propriedade de surfactante. Para eliminar essas desvantagens são usados surfactantes sintéticos (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003; TAMIME, 2008).

2.5.3.4 Quelantes ou sequestrantes

Os quelantes permitem eliminar os íons de magnésio e cálcio presentes na água para que não precipitem e formem depósitos minerais, mas também podem dissolver os depósitos minerais já formados nas superfícies se for empregado um agente quelante forte. Agentes quelantes comuns são o etileno-diamino tetra-acético (EDTA), nitrilotriacelato (NTA) e imidodisuccinato (IDS) (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005). A principal desvantagem dos quelantes tais como EDTA é que eles são caros e se requerem em elevadas

quantidades para remover depósitos se os resíduos estiveram em camadas profundas (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003).

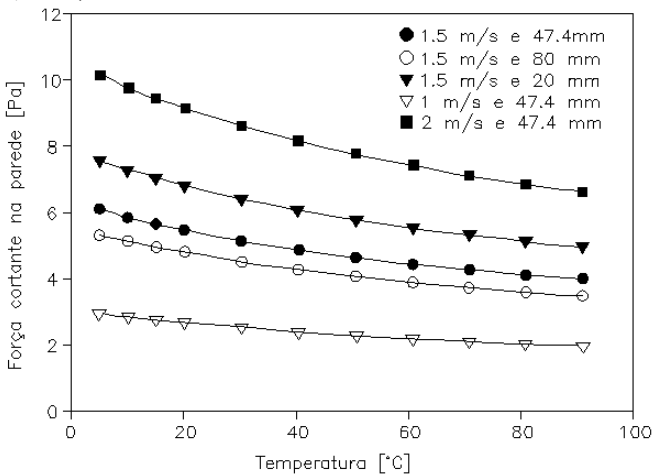
2.5.4 Quarto T: Turbulência

Para garantir a remoção dos depósitos de sujeira requiere-se da ação de alguma força. No COP a força vem do trabalho braçal ao esfregar as superfícies com escova, esponja, etc. No processo CIP a ação mecânica que permite a remoção da sujeira é obtida da energia cinética das soluções de limpeza, e a energia cinética se torna em força cortante nas paredes das tubulações ou tanques devido ao gradiente de velocidade produzido pelas condições de não deslizamento nas mesmas (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003). A tensão de cisalhamento (Equação 2.1) depende da queda de pressão e as dimensões da tubulação (TAMIME, 2008). A Figura 2.7 mostra que a velocidade tem um maior efeito na força cortante comparada com o efeito da temperatura ou o diâmetro das tubulações.

$$\tau_w = \frac{\Delta P D}{4L} \quad (2.1)$$

Onde τ_w é a tensão de cisalhamento, ΔP é a queda de pressão, D o diâmetro da tubulação e L o comprimento.

Figura 2.7. Força cortante em tubulações para diferentes velocidades (adaptado de Jensen, 2002)



Para melhorar a limpeza, o fluxo deve ser turbulento, pois favorece os fenômenos de transferência de calor e de massa das soluções de limpeza para as distintas camadas de sujeira, o que não acontece em um fluxo laminar. O objetivo é reduzir a camada laminar que existe entre as superfícies e as soluções de limpeza. A camada laminar (ou viscosa) deve ser o menor possível, pois quanto menor melhor é a transferência de calor e massa do detergente para a sujeira (LELIEVELD; MOSTER; HOLAH, 2005).

Existe pouca flexibilidade com relação à turbulência, pois sendo crítica para a remoção da sujeira, o fluxo deve ser turbulento (BOULTON; QUAIN, 2001). Para uma limpeza efetiva em tubulações, se requer velocidades de 1,5 até 3 m/s, sendo importante lembrar que quando o diâmetro da tubulação é o dobro, a vazão requerida deve ser quatro vezes isso, tendo um efeito no tamanho das bombas requeridas para o CIP (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003).

A necessidade de uma velocidade mínima sugerida para garantir uma limpeza eficaz, de 1,5 m/s, pode ser observada na Figura 2.8 que mostra a relação entre o tempo requerido para a limpeza e a velocidade. Pode se observar que além de uma velocidade de 1,5 m/s não existe uma redução do tempo de limpeza, e por isso essa é a velocidade de projeto. Isso acontece devido ao efeito que tem a espessura da camada limite, em baixas velocidades a difusão das soluções é o mecanismo que governa o processo de limpeza, mas na medida em que a velocidade se incrementa a camada limite vai se tornar o suficientemente fina para que a resistência à difusão já não exerça controle e por isso aparece uma assíntota e nesse ponto outro mecanismo pode se tornar o controlador, por exemplo, a reação entre o detergente e a sujeira (TAMIME, 2008).

Para o caso da limpeza de tanques a ação mecânica vem da descida das soluções de limpeza pelo efeito da força gravitacional, formando uma película descendente (TAMIME, 2008). Precisam-se espalhar as soluções por toda a superfície interna, e isso é possível via *spray ball* ou outros dispositivos que permitem uma boa cobertura das superfícies.

A vazão recomendada em tanques é de 1,5-3,5 m³/h por cada metro de circunferência do tanque (BOULTON; QUAIN, 2001). Porém, existe muita variabilidade da espessura da camada da película que se forma nas paredes dos tanques, por isso não pode se predizer um valor exato, e o sistema é sobre dimensionado para garantir uma boa limpeza (TAMIME, 2008).

Figura 2.8. Relação entre o tempo de limpeza e velocidade das soluções (adaptado de Tamime, 2008).

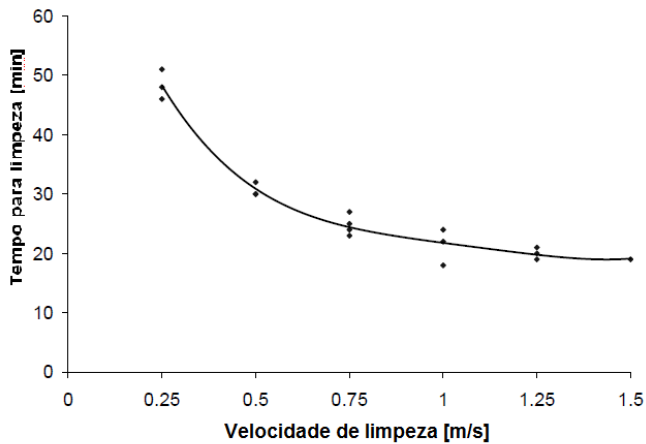
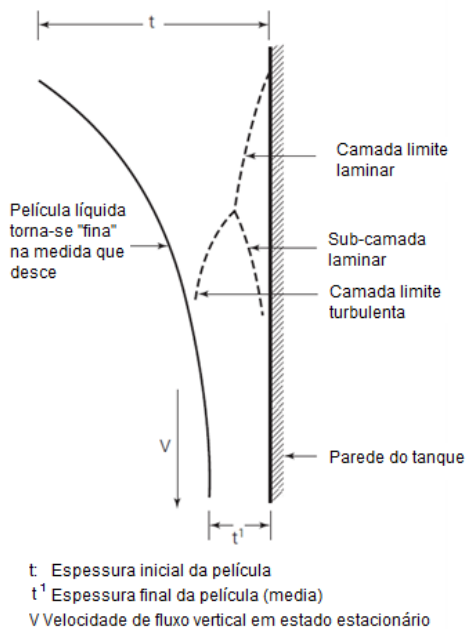


Figura 2.9. Formação da camada laminar nas paredes de tanques (adaptado de Tamime, 2008).



A Figura 2.9 mostra a formação da camada laminar na parede de um tanque, isso acontece ainda para números de Reynolds elevados. De tempo em tempo aparecem ondas que produzem películas de diferente espessura que descem na parede do tanque, isso é devido ao fluxo turbulento na interface ar-líquido.

Além das 4Ts que são fatores intrínsecos ao processo de limpeza, existem dois fatores que têm um rol relevante na eficiência e eficácia do CIP ou COP. Eles são a tecnologia (desenho higiênico) e o treinamento do pessoal.

2.5.5 Quinto T: Tecnologia - Desenho higiênico

Se as instalações e equipamentos não forem desenhados levando em conta o processo CIP, não adiantam as 4Ts anteriores. Assim, a tecnologia torna-se um parâmetro fundamental. E é justamente a tecnologia que tem desenvolvido muito conhecimento relacionado com o desenho higiênico para fazer o processo CIP eficaz e eficiente, pois o desenho higiênico dos equipamentos e das linhas de processo é importante para prevenir a formação do biofilme, e existem muitas oportunidades de reduzir ou eliminar as limitações do processo CIP graças ao desenho higiênico (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005). Segundo Tamime (2008) o desenho higiênico pode ser agrupado em três princípios básicos, descritos a seguir.

2.5.5.1 Material de construção

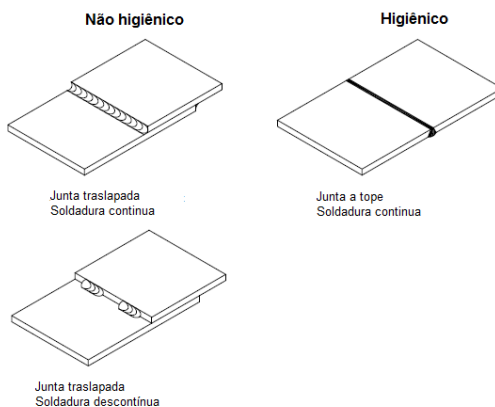
A seleção dos materiais usados nos equipamentos e instalações precisa levar em conta as características do produto e condições de operação e limpeza. Existem diferentes tipos de materiais que podem ser usados, como por exemplo, metais, polímeros, elastômeros e vidro. Prefere-se aço inoxidável em aplicações nas quais existe contato direto entre os equipamentos e o produto, pelas vantagens que tem, pois além das propriedades mecânicas o aço resiste soluções de limpeza ácidas e cáusticas e não produz ferrugem (PARTINGTON, 2012). A maioria dos equipamentos usados no processo cervejeiro é fabricada com aço inoxidável tipo austenítico AISI 304 e 316.

As superfícies em contato direto com o produto devem ser lisas, contínuas, livres de fendas ou fissuras e fáceis de limpar, para isso a rugosidade superficial média Ra deve ser menor ou igual do que 0,8 μm (NIKOLEISKI, 2012). Com isso garantem-se uma limpeza fácil e reduz-

se a acumulação de resíduos e a formação de biofilmes. Precisa-se ter atenção nas soldaduras, elas precisam ser feitas com o método de solda GTAW (*gas tungsten arc welding*) ou conhecido também como TIG (*tungsten inert gas*) e devem ser contínuas e livres de porosidades, devem ser polidas, pois não se podem deixar superfícies com rugosidade média maior do que $0,8 \mu\text{m}$ (LELIEVELD; MOSTERT; WHITE, 2001).

A Figura 2.10 mostra como devem ser feitas as soldaduras para cumprir o desenho higiênico, o tipo de junta é a de topo com soldadura contínua para não permitir a acumulação de resíduos.

Figura 2.10. Soldadura higiênica (adaptado de ISO 14159, 2002).



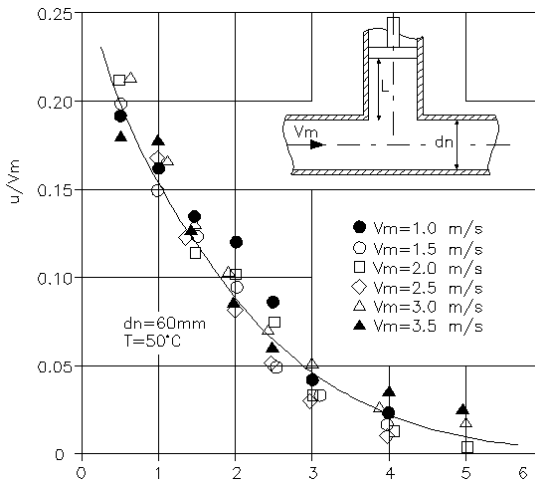
2.5.5.2 Geometria dos equipamentos

Os equipamentos não devem ter regiões ou espaços onde possa se acumular produto ou água durante muito tempo, pois uma limpeza deficiente às vezes é uma questão muito mais básica e fundamental do que o nível de turbulência, concentração do detergente ou tempo de limpeza, e sim o contato efetivo entre soluções de limpeza com a sujeira/resíduos. Tubulações horizontais de diâmetro elevado ou derivações muito compridas não ficam enchidas totalmente se o fluxo for muito baixo. Áreas com “sombras” também não permitem que as soluções de limpeza entrem em contato com a sujeira. Esses espaços ou regiões nas tubulações ou nos equipamentos nos quais as soluções de limpeza nem atingem ou atingem, mas sem velocidade suficiente, são conhecidos como pontos mortos. Os pontos mortos são um dos maiores

impedimentos para garantir turbulência durante o processo CIP (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003). Os pontos mortos não só dificultam a limpeza, como nesses espaços os micro-organismos começam a se desenvolver com maior intensidade do que em equipamentos e tubulações bem desenhadas e baseadas em padrões higiênicos (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005).

A Figura 2.11 mostra a influência do comprimento de uma derivação para uma solução de limpeza com uma vazão variável, em uma tubulação de 60 mm de diâmetro nominal e 50 °C. Na medida em que o comprimento da derivação incrementa, forma-se um ponto morto que dificulta a limpeza, pois uma velocidade de 2 m/s com uma Tee de comprimento igual ao diâmetro ($L/D = 1$), o ponto acima da tubulação principal só recebe o 15% da velocidade principal, isto é, 0,3 m/s, reduzindo as forças mecânicas que permitem a remoção dos depósitos. Quanto maior for o comprimento do ponto morto menor serão as forças disponíveis para a remoção da sujeira (LELIEVELD; MOSTER; HOLAH, 2005). O maior comprimento aconselhado para derivações, segundo Tamime (2008), é 1,5 vezes o diâmetro nominal da tubulação principal, mas com velocidades das soluções de limpeza de 1,5 m/s.

Figura 2.11. Efeito do comprimento de uma derivação (adaptado de Lelieveld; Moster; Holah, 2005).



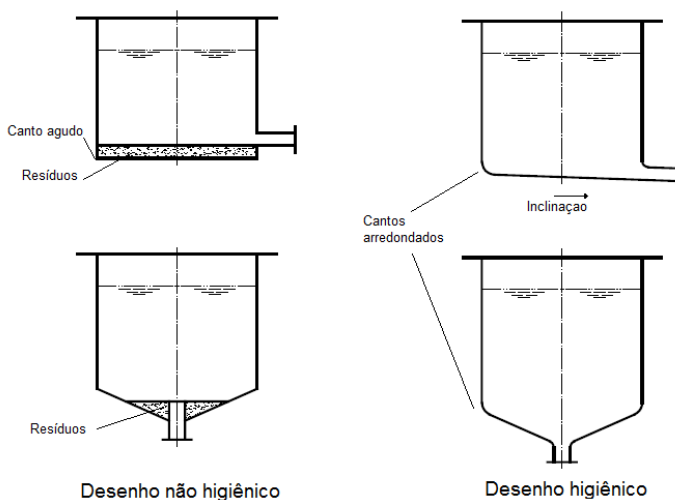
Se derivações da linha principal ou Tees forem inevitáveis, elas devem ser produzidas com contornos suaves que sejam sanitários e que

possam ser limpas, junções ou adaptações feitas “na garagem” ou fabricadas caseiramente não são sanitárias e não podem ser aceitas.

Os equipamentos não devem permitir a acumulação de soluções ou produto, isto é, devem ser *self-draining* para reduzir o perigo de crescimento microbiano ou contaminação com soluções de limpeza que podem ficar estagnadas. Para isso, os cantos precisam ser arredondados (raio de curvatura), e com uma pendente aconselhada maior ou igual do que 3° (LELIEVELD; MOSTERT; WHITE, 2001).

A Figura 2.12 mostra a comparação entre dois desenhos, um com cantos agudos e sem permitir a capacidade de esvaziamento total ou *self-draining*, e outro oposto que não permite a acumulação seja de produto ou água.

Figura 2.12. Desenho de equipamentos *self-drining* (adaptado de ISO 14159, 2002).



O desenho sanitário é exigido em todos os componentes do processo, não só nos equipamentos, mas também nas tubulações e acessórios (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003). É preciso levar em conta que os micro-organismos não precisam de muito para se desenvolver e, se existir algum resíduo de produto ou água que permanecer mais tempo do que o desejado fornece um entorno favorável para seu crescimento e desenvolvimento (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005). A Figura 2.13 mostra a inclinação aconselhada, onde as

tubulações não devem permitir a acumulação de água ou produto, pois isso favorece o crescimento de micro-organismos.

A Figura 2.14 mostra a forma de instalar uma redução nas tubulações, de modo que não existam câmaras onde o ar, produto ou soluções de limpeza possam ficar estagnados.

Figura 2.13. Tubulações *self-draining* (adaptado de ISO 14159, 2002).

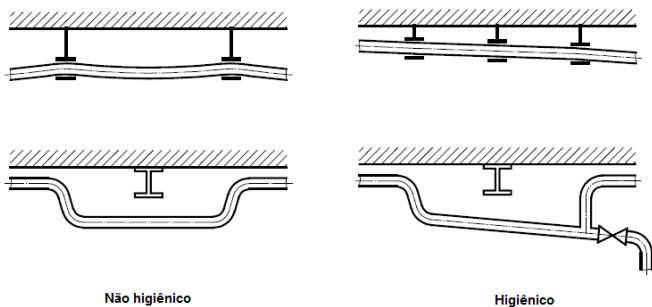
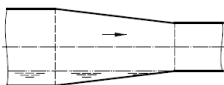
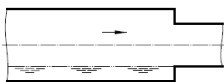


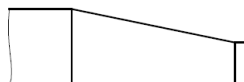
Figura 2.14. Acessórios com desenho higiênico: reduções (adaptado de ISO 14159, 2002).

Desenho não higiênico



a) Redução concêntrica

Desenho higiênico

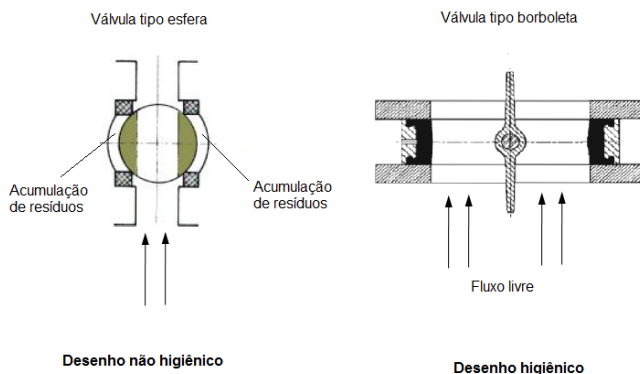


b) redução Excêntrica

Com relação às válvulas (Figura 2.15), prefere-se o uso de válvulas tipo borboleta, pois elas são limpáveis durante o CIP, o que não acontece com as válvulas tipo esfera, que acumulam resíduos que não podem ser eliminados.

Pode ser observado na Figura 2.15 que existe um espaço entre a esfera e as gaxetas fixas no corpo da válvula onde podem se acumular os resíduos, e por isso não é aconselhado o uso de válvulas tipo esfera em contato com produto.

Figura 2.15 Acessórios com desenho higiênico: válvulas (adaptado de Dickenson, 1999).



Nem todas as instalações ou equipamentos têm sido construídos levando em conta o cumprimento desses padrões higiênicos, mas ainda assim é possível produzir produtos em um nível microbiológico aceitável nesses equipamentos e instalações. Porém, segundo Tamime (2008), existem as seguintes implicações econômicas, produtivas e de segurança alimentar:

- Períodos de produção mais curtos, pois se requiere uma limpeza mais frequente.
- Maiores tempos de limpeza para poder garantir que foram removidos todos os resíduos.
- Um processo menos consistente e menos robusto, existe variabilidade e o perigo de cometer erros está presente, precisando somente de um momento de descuido para obter resultados inadequados.
- Requerem-se maiores provas de produtos e equipamentos, isto é, recuar da gestão da qualidade para o controle de qualidade, pois se precisa estar pendiente de evitar erros no processo de produção.

2.5.5.3 Limpeza

Os equipamentos devem ser fáceis de desmontar para limpeza. Devem permitir realizar inspeções regulares com facilidade e se for usado CIP precisa-se demonstrar que os resultados obtidos são bons (TAMIME, 2008).

2.5.6 Sexto T: Treinamento

Não adianta um sistema ser bem desenhado se as pessoas que tem a responsabilidade de operá-lo e fazê-lo funcionar não sabem como fazer isso. Para garantir que o pessoal faça as coisas do jeito correto, com o menor custo e no menor tempo precisa-se do treinamento junto com procedimentos operacionais (TAMIME, 2008), pois o treinamento é um dos meios mais eficientes para garantir um processo de limpeza eficaz e combater a possível formação do biofilme (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005; RISTOVSKA et al., 2010; SCHEFFLER, 2013), devido a que existe uma relação direta entre deficiências no processo de limpeza e falta de treinamento (TIMMERMAN, 2012).

O treinamento é importante e necessário, pois além de procurar uma limpeza adequada precisa-se garantir a segurança do pessoal, pois durante o processo CIP e COP usam-se substâncias químicas que podem representar um risco para a saúde e precisam ser manipuladas de uma forma apropriada (TAMIME, 2008).

2.6 CONFIGURAÇÕES DOS SISTEMAS CIP

Existem basicamente três alternativas para o desenho dos sistemas CIP, e a complexidade e as características dependem do tipo de configuração. Porém, existe flexibilidade em quanto à automação, mecanismo de aquecimento, etc. Segundo Tamime (2008), podem-se achar sistemas CIP de uso único, de recuperação parcial e de recuperação completa.

Elementos comuns para esses três tipos são: sensores de fluxo FS, sensores de condutividade CT, sensores de temperatura TX, sensores de nível alto HL, sensores de nível baixo LL, filtros F, válvulas V, bombas B, trocadores de calor PHE.

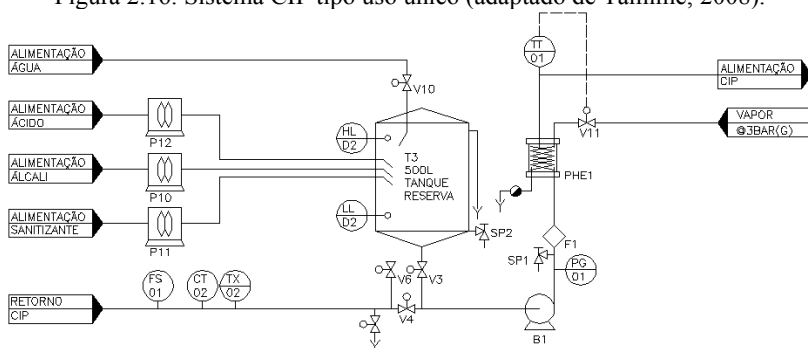
2.6.1 Sistemas de uso único

Nesse tipo de sistemas as soluções de limpeza usadas são descartadas para o dreno depois do CIP, sendo usadas uma vez só. Esses sistemas são os mais simples e os menos caros no investimento inicial, porém no longo prazo podem resultar muito mais caros (LELIEVELD; MOSTERT; WHITE, 2001; TAMIME, 2008). Mas existem algumas aplicações que precisam ter a característica de usar as soluções de

limpeza uma vez só, quando se requer garantir a esterilidade total como, por exemplo, em processos assépticos UHT (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005).

A Figura 2.16 mostra uma configuração típica de um sistema de um uso só, as soluções de limpeza são acondicionadas no tanque T3 com água e detergentes ácidos, alcalinos e sanitizantes por meio das bombas tipo diafragma P10, P11, P12. As soluções são aquecidas quando recirculam entre o trocador de calor PHE e o tanque, quando prontas são enviadas ao equipamento ou processo a limpar.

Figura 2.16. Sistema CIP tipo uso único (adaptado de Tamime, 2008).



2.6.2 Sistemas de recuperação

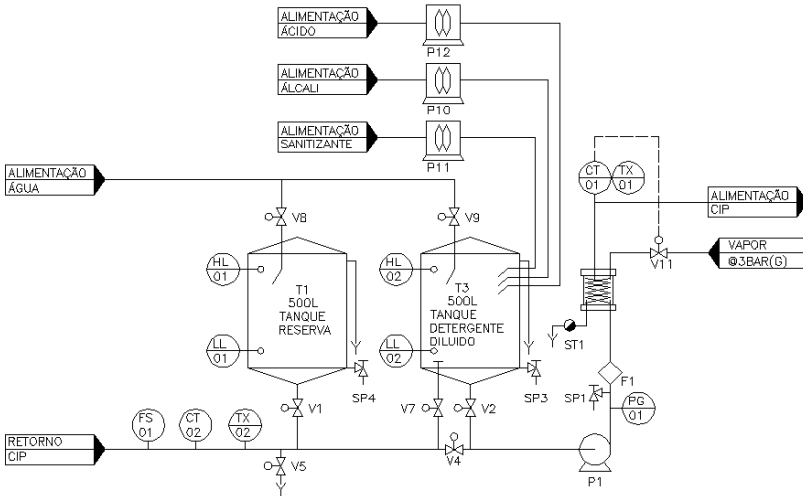
Nesse tipo de sistemas as soluções de limpeza são recuperadas tantas vezes quanto seja possível, principalmente de processos que não têm muitos resíduos, graças ao pré enxágue que remove a sujeira grosseira, as soluções de limpeza ficam quase limpas (LELIEVELD; MOSTERT; WHITE, 2001). A recuperação de soluções é feito graças à automação do processo baseado em um sensor de condutividade (CT) que permite separar as soluções de limpeza da água durante as distintas etapas do CIP. Os sistemas de recuperação podem ser classificados em sistemas de recuperação parcial e sistemas de recuperação total.

2.6.2.1 Sistemas com recuperação parcial

Nessa configuração existe um tanque para recuperação do detergente diluído, opera como um sistema de recuperação total, porém a água do enxágue final é jogada para o dreno e o pré- enxágue é feito

com água limpa (TAMIME, 2008). A Figura 2.17 mostra um sistema de recuperação parcial com dois tanques, um serve para acondicionar as soluções de limpeza e o outro para recuperar as soluções de processos CIP anteriores.

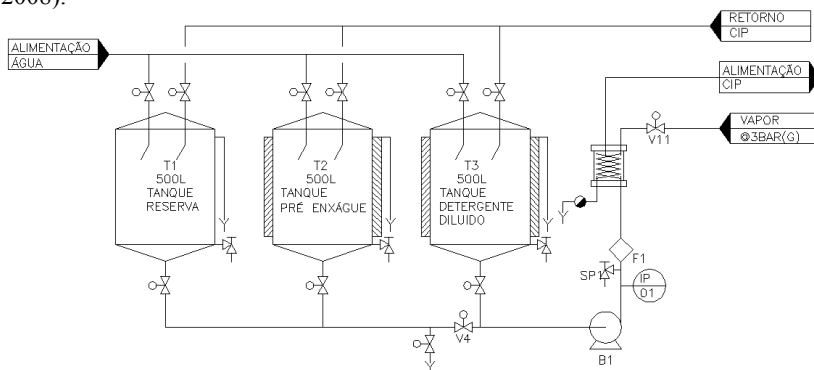
Figura 2.17. Sistema CIP tipo recuperação parcial (adaptado de Tamime, 2008).



2.6.2.2 Sistemas com recuperação total

Também conhecido como sistema de três tanques, o sistema recupera o detergente ácido e alcalino e a água empregada no enxágue final. A água recuperada é empregada no seguinte processo CIP como pré-enxágue (TAMIME, 2008). A Figura 2.18 mostra um sistema para recuperação total com 3 tanques, dois dos quais são empregados para a recuperação e acondicionamento das soluções de limpeza.

Figura 2.18. Sistema CIP tipo recuperação completa (adaptado de Tamime, 2008).



2.7 A VALIDAÇÃO DO PROCESSO CIP

Uma limpeza adequada é muito importante em qualquer indústria que precise a remoção de resíduos físicos, químicos ou microbiológicos; por exemplo, na indústria farmacêutica, alimentos e bebidas. E para o caso da indústria de processamento de alimentos líquidos, a limpeza é um pré-requisito (SMIT, 2003).

Já em 1963 as Boas práticas de manufatura (GMPs) da Administração de alimentos e drogas dos Estados Unidos (FDA) indicavam que: “os equipamentos devem ser mantidos adequadamente limpos” (FDA, 2004).

Levando em conta isso, o CIP, é um processo de grande importância especialmente na cervejaria, e precisam-se metodologias que permitam obter informação confiável sobre o nível de limpeza obtido depois de um processo CIP (SALO; FRIIS; WIRTANEN, 2008).

Isso pode se conseguir mediante a validação do processo, pois a validação é a obtenção de informação documentada de que o processo está produzindo os resultados desejados (FDA, 2014).

Assim a validação do CIP permite realizar a verificação integral do processo e obter evidência documentada das condições do processo e avaliar se a limpeza está sendo feita do jeito correto ou realizar as correções necessárias (TAMIME, 2008; TIMMERMAN, 2014).

Existe muita informação relacionada com padrões para a validação da limpeza em processos farmacêuticos, por exemplo: a FDA desenvolveu a “*Guide to inspections validation of cleaning processes*” (FDA, 2014), também o Comitê de ingredientes ativos farmacêuticos

(APIC) desenvolveu a “*Cleaning validation in active pharmaceutical ingredients manufacturing plants*” (APIC, 1999), a União Europeia desenvolveu o documento “*Qualification and validation*” (EUROPEAN UNION, 2001), etc. Todos esses padrões e muitos outros podem ser agrupados no denominado “Plano diretor de validação farmacêutico” (HAIDER, 2002).

Porém no relacionado com a indústria de alimentos e bebidas existe pouca informação referente à validação de processos de limpeza. Tamime (2008) em uma forma muito resumida descreve a validação do CIP, mas o Grupo europeu de engenharia e desenho higiênico (EHEDG) apresenta de uma forma simples, sequencial e detalhada o processo para realizar a validação de processos CIP na indústria de alimentos e bebidas.

A metodologia proposta por EHEDG destaca-se, pois tem sido aplicada na indústria com bons resultados (GÖRANSSON; PETERSSON, 2012; NICOLAY; SCHMITT, 2012; TIMMERMAN, 2014).

Mesmo que aplicada em indústrias diferentes (farmacêutica, alimentos e bebidas), muitas etapas e conceitos empregados para a validação do processo CIP são comuns.

As etapas da validação do CIP segundo EHEDG podem ser observadas na Figura 2.19.

Etapas comuns para a validação do CIP na indústria farmacêutica, alimentos e bebidas são: análise de riscos, qualificação do desenho, qualificação das instalações, qualificação operacional e qualificação do desempenho.

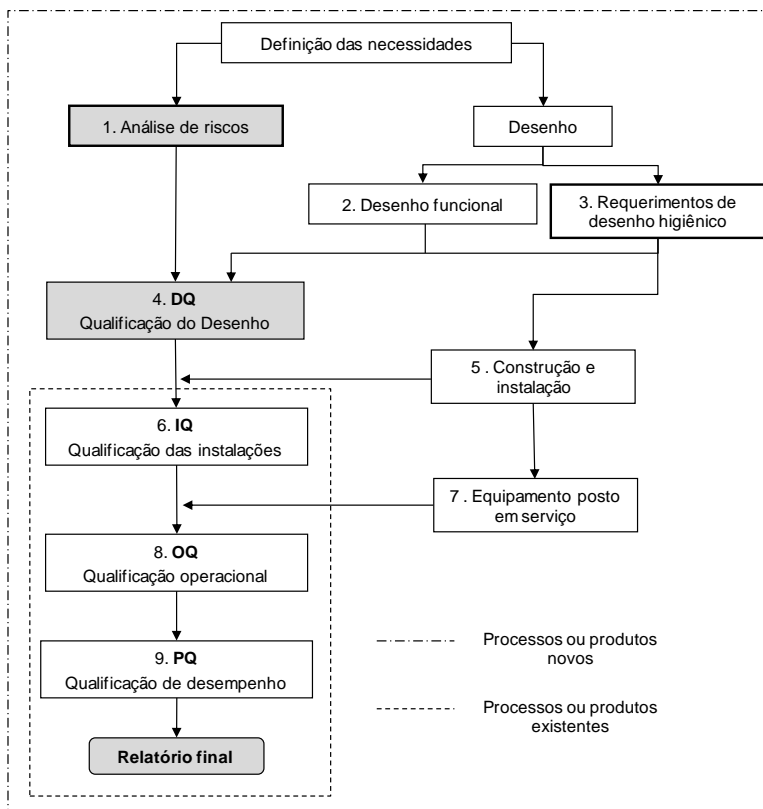
A validação CIP pode ser aplicada para processos/equipamentos existentes ou para novos processos/equipamentos (na fase de desenvolvimento/desenho), e a diferença é que algumas etapas não são necessárias para processos já existentes.

Durante as diferentes etapas de validação identificam-se os perigos existentes, identificam-se as características da sujeira acumulada, avaliam-se as 6Ts: temperatura, tempo, titulação, turbulência (vazão), tecnologia (desenho higiênico), treinamento (procedimentos e protocolos de limpeza POP)⁹. Também se verificam os níveis de limpeza obtidos com os procedimentos de limpeza atuais para assim definir as ações a serem realizadas para corrigir os problemas identificados (NICOLAY; SCHMITT, 2012).

⁹ Todos esses fatores já foram descritos com detalhe anteriormente.

A seguir se definem as etapas para a validação de um processo existente que é frequentemente aplicado na indústria, omitem-se as etapas correspondentes ao processo geral devido a que o mesmo é aplicado por fabricantes de equipamentos (GÖRANSSON; PETERSSON, 2012).

Figura 2.19. Fluxograma que descreve o processo de validação geral (adaptado de Nicolay e Schmitt, 2012).



2.7.1 Qualificação das instalações

Nesta etapa se verifica que todos os equipamentos, suas partes e as linhas de processo estejam instalados apropriadamente segundo

diagramas P&I, diagramas de fluxo, especificações funcionais, etc. (HAIDER, 2002; GÖRANSSON; PETERSSON, 2012).

Verificam-se e documentam-se as condições de desenho higiênico (tecnologia) principalmente avalia-se a existência de pontos mortos e outros pontos onde possa existir a acumulação de resíduos, pois o desenho higiênico é um pré-requisito para atingir bons resultados do processo CIP (GÖRANSSON; PETERSSON, 2012) ou para aprimorar ou melhorar a eficiência dos sistemas CIP (LELIEVELD; MOSTER; HOLAH, 2005).

Empregam-se como padrões referenciais de desenho higiênico os estabelecidos nas GMP, EHEDG, ISO, etc. (NIKOLEISKI, 2012).

2.7.2 Qualificação operacional

Consiste em obter evidencia documentada de que todos os componentes do processo/equipamento funcionam de acordo com as especificações e parâmetros estabelecidos, verificam-se os procedimentos operacionais e o treinamento do pessoal (HAIDER, 2002).

Para o caso do CIP, o objetivo desta fase é avaliar se o processo CIP trabalha como foi planejado; verifica-se a combinação dos parâmetros: temperatura, tempo, turbulência, titulação (4Ts), esses parâmetros devem ser monitorados e registrados e devem estar de acordo com os limites especificados; também se verifica se existem e se são respeitados os procedimentos operacionais de limpeza POP (GÖRANSSON; PETERSSON, 2012).

2.7.3 Qualificação do desempenho

Essa etapa fornece evidencia documentada de que o processo permite obter os resultados desejados (HAIDER, 2002).

Especificamente para o processo CIP, o objetivo desta etapa é demonstrar que o equipamento está completamente limpo (GÖRANSSON; PETERSSON, 2012).

Existem diferentes métodos para avaliar o nível de limpeza em uma superfície obtido depois do processo CIP. Tamime (2008) sugere uma verificação inicial mediante os sentidos, assim uma superfície limpa não tem cheiros esquisitos, as superfícies devem estar claras,

brilhantes e sem cores que não sejam próprias do material e ao tacto as superfícies não devem apresentar aparência ensaboada, gomosa, etc.

A análise sensorial pode ser complementada com uma análise mais complexa como a quantificação do ATP, o uso de *swabs* para contagem de microrganismos nas superfícies, amostragem da água de enxágue ou do produto (TAMIME, 2008; FDA, 2004).

2.7.4 Relatório final

Finalmente o relatório final que mediante uma análise dos resultados obtidos nas fases anteriores do processo de validação deve expor e clarificar as causas da variabilidade do processo CIP (LELIEVELD; MOSTER; HOLAH, 2005), e deve encaminhar uma apropriada ação quando são identificados defeitos no sistema (TAMIME, 2008).

Depois da correção dos defeitos deve ser feita uma nova validação para demonstrar que o processo é estável e permitir garantir resultados consistentes com os limites estabelecidos (LELIEVELD; MOSTER; HOLAH, 2005).

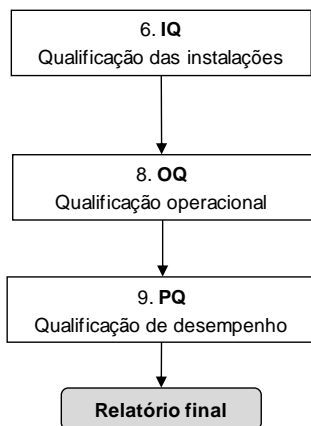
3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram desenvolvidas experimentações em dois níveis: um no local da microcervejaria para implementar a metodologia de validação do CIP (*Cleaning in place*) segundo o EHEDG (*European Hygienic Engineering Design Group*), para avaliar de uma forma integral os fatores conhecidos como 6Ts (temperatura, tempo, titulação, turbulência, tecnologia e treinamento), e outro em laboratório para avaliar a importância dos fatores conhecidos como 4Ts (temperatura, tempo, titulação, turbulência) para a remoção de biofilme.

3.1 VALIDAÇÃO DO PROCESSO CIP DE FERMENTADOR

Com o objetivo de aprimorar o processo CIP e identificar pontos críticos, foi selecionada a etapa mais importante na fabricação de cervejas, que é a fermentação. A validação do CIP permite estabelecer condições atuais do processo CIP, isso é a avaliação integral do CIP (6Ts) e propor melhorias para garantir uma limpeza eficaz e eficiente. Para a avaliação do processo CIP do tanque de fermentação empregouse a metodologia proposta por EHEDG para linhas ou processos de produção existentes, cujas etapas podem ser observadas na Figura 3.1.

Figura 3.1. Processo de validação simplificado para linhas ou processos existentes (adaptado de Nicolay e Schmitt, 2012).



3.1.1 Qualificação das instalações

Nessa etapa verificou-se se os equipamentos e as instalações (tubulações, instrumentos de medição e válvulas), não só das linhas de produto, mas também se os serviços (água, ar, vapor, refrigerante, CO₂) estavam de acordo com as sugestões de desenho higiênico, e verificou-se se os materiais empregados eram apropriados para o processo (EUROPEAN UNION, 2001; GÖRANSSON; PETERSSON, 2012). Os padrões usados para avaliar o desenho higiênico foram os estabelecidos por EHEDG, principalmente os padrões relacionados com o desenho higiênico dos equipamentos e acessórios usados na indústria de alimentos, eles são: Doc. 8: *Hygienic equipment design criteria*, Doc. 13: *Hygienic design of equipment for open processing* e Doc. 14: *Hygienic design of valves for food processing*, estes documentos estabelecem os critérios mínimos necessários para reduzir os perigos de acumulação de resíduos ou formação de biofilme (EHEDG, 1996; EHEDG, 2004a; EHEDG, 2004b).

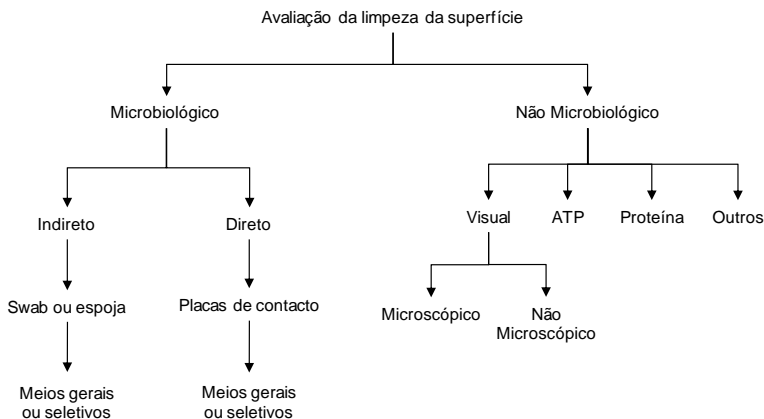
3.1.2 Qualificação operacional

Verificou-se se o sistema funcionava de acordo com o planejado, isso é, verificaram-se os valores de temperatura, tempo, concentração, turbulência, procedimentos operacionais e treinamento do pessoal. Para avaliar o treinamento do pessoal verificou-se se eles tinham recebido treinamento referente ao processo de limpeza e manipulação de químicos (EUROPEAN UNION, 2001; GÖRANSSON; PETERSSON, 2012).

3.1.3 Qualificação do desempenho

Na qualificação do desempenho verificou-se o nível de limpeza obtido nas condições atuais mediante o acompanhamento diferentes processos de limpeza (EUROPEAN UNION, 2001; GÖRANSSON; PETERSSON, 2012). Para a verificação e/ou monitoramento do nível de limpeza existem vários métodos que são mostrados na Figura 3.2. Cada um desses métodos tem vantagens e desvantagens. Empregou-se a medição do ATP, pois é um dos métodos mais empregados na indústria alimentícia (KISMARTIN et al, 2013; MOORE, G., 2010).

Figura 3.2. Alternativas para avaliação da limpeza de superfícies (adaptado de Lelieveld, Moster, Holah, 2005).



3.1.3.1 Análise do ATP

A existência de ATP pode ser quantificada e medida mediante equipamentos apropriados e expressada em unidades relativas de luz (RLU - *relative light units*) ou fótons que são liberados quando o ATP reage com a enzima luciferina/luciferasa. Para as análises do ATP, amostras foram recolhidas de pontos previamente definidos do tanque, depois do CIP, mediante *swab* pronto para usar *UXL100 Clean-Trace*TM da 3M, segundo as recomendações do fabricante. O ATP foi medido utilizando um luminômetro, também da 3M, *Clean-Trace*TM *NG Luminometer*, modelo NG3, Saint Paul, Minnesota.

3.1.3.2 Indicadores chave de desempenho ou KPIs do CIP

Quantificaram-se os insumos usados no processo CIP mediante indicadores de desempenho ou KPI. Os indicadores de desempenho para um processo CIP em uma cervejaria calculados foram os sugeridos por Goode (2012) e que quantificar o consumo de: energia elétrica empregada durante o CIP por m³ de produto produzido (kWh/m³), volume de água empregada no CIP por m³ de produto produzido (m³/m³) e o tempo de duração do CIP por m³ de produto produzido (minutos/m³).

3.2 EXPERIMENTOS DO CIP EM LABORATÓRIO

Os experimentos do CIP no laboratório têm por objeto avaliar os fatores relevantes durante o CIP para obter uma limpeza eficaz.

3.2.1 Microrganismo

Mesmo que na cerveja possam existir vários tipos microrganismos deteriorantes como bactérias ácido lácticas, bactérias ácido acéticas e leveduras selvagens (ver quadros 2.1, 2.2 e 2.3), para formação do biofilme, escolheu-se a bactéria *Acetobacter aceti*, pois é considerada como um microrganismo indicador devido a que sua presença é frequentemente associada com deficiências ou erros no processo CIP (STORDGÅRDS, 2000).

A bactéria *Acetobacter aceti*, foi fornecida pela Fundação André Tosello CCT 179.

3.2.2 Meios de propagação e cultivo

Para a preparação do inóculo e também para contagem das colônias em placa, foi empregado meio manitol¹⁰. Para a formação do biofilme foi empregado mosto de sacarose¹¹. Todos os meios foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos e 120 °C (ATLAS, 2010).

3.2.3 Placas de prova

Biofilmes bacterianos foram preparados em placas de prova, visando simular as paredes do fermentador. Foram usadas placas de aço inoxidável AISI 304 de tamanho 40x40 mm e espessura de 1 mm, com acabamento superficial 2B. Essas placas foram limpas com solução de

¹⁰ Composição: manitol 25g/l, agar 15 g/l, extrato de levedura 5 g/l, peptona 3g/l (ATLAS, 2010).

¹¹ Composição e preparação: Extrato de levedura 1 g/l, solução de mosto 500 ml/l, solução de sacarose 500 ml/l. Solução de mosto: extrato de malte 55 g/500 ml, água destilada 500 ml. Solução de sacarose: sacarose 50 g/500 ml, água destilada 500 ml. Misturar bem os componentes em cada solução e finalmente misturar as soluções para a preparação do meio (ATLAS, 2010).

hidróxido de sódio 1% para eliminar qualquer resíduo ou sujeira antes da formação do biofilme.

3.2.4 Formação de biofilme

O micro-organismo foi primeiramente repicado do tubo matriz para placas de Petri com meio sólido. Depois foram propagados em frasco Erlenmeyer contendo meio líquido manitol em uma temperatura de 30 °C durante 48h e agitação 120 rpm. As placas de aço inoxidável foram submersas em meio mosto de sacarose líquido e depois autoclavadas durante 15 minutos e 120 °C. Para formação do biofilme na superfície das placas, inoculou-se uma concentração celular inicial de 1×10^7 UFC, e o conjunto (placa-meio-microrganismos) foi incubado durante 96 horas com agitação moderada de 80 rpm e temperatura de 30 °C. O meio foi renovado depois das primeiras 48 horas (STORDGÅRDS, 2000; GOODE et al, 2013; KUMARI; SARKAR, 2014).

Depois de 96 horas, as placas foram enxaguadas três vezes com água destilada esterilizada para remover células não aderidas ao biofilme (KUMARI; SARKAR, 2014), e colocadas no tanque do *Micro Brewing System*. As placas foram fixadas em duas posições diferentes: na parte superior do tanque que recebe os jatos do aspersor da solução de limpeza e no fundo submersa na solução de limpeza, isso para avaliar as condições do processo CIP em um tanque que não tem unidade CIP externa.

3.2.5 Equipamento

A Figura 3.3 mostra o equipamento *Micro Brewing System* usado para realizar o CIP e avaliar a remoção do biofilme formado nas placas de prova. O *Micro Brewing System* do Laboratório Bioprocessos MIP da UFSC tem capacidade de 20 L, diâmetro 278 mm e aspersor giratório de soluções de limpeza.

Figura 3.3. Equipamento *Micro brewing system*.



Para realizar a quantificação do ATP empregou-se *swabs* ULX100 e o luminômetro *Clean-Trace™ NG Luminometer*. Para a remoção das células aderidas nas placas de prova (antes e depois do CIP) empregou-se um sonicador marca Unique, modelo USC1400, com potência 120 W.

3.2.6 Processo CIP

As placas de prova foram previamente fixadas no tanque e o processo de limpeza foi realizado mediante a recirculação de hidróxido de sódio em diferentes vazões, temperaturas e concentrações. Os diferentes níveis das variáveis para o desenho experimental podem ser observados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Níveis das variáveis dos ensaios de laboratório

Fator	Nível	Valor
Temperatura (°C)	Superior	34
	Inferior (ambiente)	26
Concentração % (m/m)	Superior	0,1
	Inferior	0,0
Vazão (L/min)	Superior	15
	Inferior	11

Após a recirculação com soda cáustica, as placas foram recolhidas e enxaguadas com água destilada esterilizada até verificar a ausência de resíduos de soda, verificado com fitas para medir pH (KUMARI; SAKAR, 2014), e foram recolhidas amostras para análises.

3.2.7 Avaliação do processo CIP

Para o monitoramento do nível de limpeza obtido após o CIP no laboratório, empregou-se a análise microbiológica e análise por ATP.

3.2.7.1 Análise microbiológica

Para quantificar a formação do biofilme foram recolhidas amostras microbiológicas em duplicata das placas sem realizar CIP. Depois do CIP as placas de prova foram colocadas em um recipiente contendo 50 mL de solução salina esterilizada e a remoção das células ainda aderidas foi feita mediante o uso do sonicador durante 30 segundos. Depois foram preparadas diluições de 10^{-1} e 10^{-2} para cada amostra. Mediante a técnica de espalhamento de um volume de 100 microlitros das diluições foram feitas placas de contagem em meio manitol. As placas foram incubadas a 28 °C durante 72 h. Os resultados microbiológicos foram reportados como o número de unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado (UFC/cm²), mediante as Equações 3.1 e 3.2 (SALO et al., 2000).

$$N_V = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1n_2 + 0.01n_3)d} \quad (3.1)$$

Onde:

N_V = número de colônias por mL de amostra

ΣC = somatório das colônias contadas em todas as placas mantidas

n_1 = número de placas mantidas a partir da primeira solução usada (que na prática pode ser a solução pura seguida de sucessivas diluições)

n_2 = número de placas mantidas a partir da segunda solução usada

n_3 = número de placas mantidas a partir da terceira solução usada

d = fator de diluição correspondente à primeira solução usada: d é 1 se a solução pura for empregada e 0,1 se a primeira dissolução for usada e assim por diante.

$$N_A = \frac{N_V V}{A} \quad (3.2)$$

Onde: N_A = número de colônias por cm²; V = volume a amostra (50mL); A = área das placas de prova (= 16 cm²).

3.2.7.2 Análise do ATP

Amostras para a análise do ATP foram recolhidas das placas de prova antes e depois do CIP mediante o *swab UXL100 Clean-Trace™*, segundo as recomendações do fabricante, e foi medido o ATP utilizando o luminômetro *Clean-Trace™ NG Luminometer*. As quantidades de ATP foram expressas como RLU (*relative light units*)/cm².

3.2.8 Quantificação da remoção do biofilme

A remoção do biofilme foi avaliada mediante a quantificação das células viáveis ainda fixas nas placas de prova depois do CIP (LELIÈVRE et al., 2002). A redução logarítmica das células viáveis nas placas de prova em UFC/cm² foi calculada mediante a Equação 3.3, proposta por Kumari e Sacar (2014).

$$\text{Redução logarítmica (R log)} = \text{Log } N - \text{Log } n \quad (3.3)$$

Onde: N representa a contagem das UFC/cm² antes do CIP e n representa a contagem das UFC/cm² depois do CIP.

Também foi calculada a redução logarítmica do valor do ATP, usando a equação 3.4 (SALA et al., 2008).

$$\text{Redução logarítmica (R logRLU)} = \text{Log } R - \text{Log } r \quad (3.4)$$

Onde: R representa o valor do ATP em RLU antes do CIP e r representa o valor do ATP em RLU depois do CIP.

3.2.9 Análises estatísticas

Para a o desenho experimental e análise estatística foi usado o programa Statistica v. 7.0 (Statsoft). Para avaliar o ajuste do modelo de regressão que representa a remoção do biofilme foi realizada uma análise de variância (ANOVA) e a prova da distribuição *t-student* para a avaliação da significância com um índice de confiabilidade de 95% ($\alpha=0.05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VALIDAÇÃO DO CIP DO FERMENTADOR

4.1.1 Qualificação das instalações

Os diferentes elementos que conformam o tanque de fermentação podem ser observados no Apêndice A, que mostra o diagrama P&I (*piping and instrumentation*). No tanque de fermentação foram identificadas cinco não conformidades relacionadas ao desenho higiênico, e são descritas em detalhe no Apêndice B. Essas não conformidades têm a ver com derivações (tee) muito compridas, junções que geram espaços onde podem se acumular resíduos ou micro-organismos, válvulas e acessórios inapropriados para processo alimentício, e acabamento superficial das soldagens inapropriado.

A derivação existente no fermentador tem uma relação comprimento/diâmetro (L/D) = 8, muito maior do que 1,5, produzindo a acumulação soluções de limpeza/água no extremo onde estão instaladas as válvulas de alívio (vácuo e pressão). O problema com derivações com relações L/D muito grandes foi descrito por Jensen; Stenby e Nielsen (2002) que demonstraram experimentalmente e mediante modelagem CFD (*Computational Fluid Dynamics*) que em esse tipo de acessórios com uma relação L/D além de 1,5 geram pontos mortos, devido a que a velocidade no ponto mais distante é reduzida e não se consegue remover os resíduos/soluções acumuladas.

No interior do tanque observou-se também que existem soldas com acabamento superficial irregular, e nessa superfície acumulam-se mais facilmente resíduos que podem permitir o desenvolvimento de micro-organismos. O efeito da rugosidade superficial foi evidenciado por Cluet (2001), que avaliou diferentes rugosidades em um fermentador e concluiu que mesmo que as superfícies fiquem sem resíduos orgânicos do processo de fermentação, o número de microrganismos viáveis diminui naquelas superfícies com um acabamento superficial mais fino. No entanto Hilbert et al., (2003) não acharam relação causal entre o acabamento superficial do aço inoxidável e a adesão/remoção de micro-organismos. Mesmo assim, todos os padrões relacionados com a produção de alimentos sugerem que o acabamento superficial em superfícies em contato com alimento seja no mínimo $0,8 \mu\text{m}$ (EHEDG, 1996; ISO, 2002).

No tanque de fermentação existem 3 válvulas tipo esfera: duas delas no indicador de nível estão em contato direto com produto e outra na tubulação de ingresso do CIP, em contato direto com soluções de limpeza. Esse tipo de válvula não é apropriado para instalações alimentícias, pois segundo Tamime (2008) as válvulas tipo esfera têm um espaço onde podem ficar resíduos químicos ou microbiológicos.

O uso de válvulas e/ou conexões inapropriados na indústria alimentícia/farmacêutica segundo Suvarna et al. (2011), têm produzido problemas de contaminação. Todas essas não conformidades podem ser consideradas pontos mortos, pois apresentaram maior dificuldade para a remoção de resíduos e dificultam a obtenção de um CIP eficaz e eficiente, e até mesmo os resíduos não podem ser eliminados. Esses pontos mortos devem ser eliminados, pois como foi evidenciado por Nikolay e Schmitt (2012) depois de identificar e eliminar todos os pontos com deficiências de desenho higiênico conseguiram obter um CIP adequado. Também segundo Storgards (2000) a capacidade de limpeza de uma superfície depende do tamanho e tipo da irregularidade da superfície, pois poros, fendas e fissuras retêm bactérias depois da limpeza.

4.1.2 Qualificação operacional

Para avaliar o funcionamento integral do sistema, foram acompanhados quatro processos de limpeza do tanque de fermentação. O produto produzido foi uma cerveja estilo Pilsen. O processo de limpeza realizado atualmente é uma combinação de COP e CIP. As diferentes fases observadas durante o acompanhamento são descritas em detalhe no Apêndice C. Depois do esvaziamento do tanque de fermentação/maturação ficam resíduos que podem ser assim caracterizados:

- a) Na parte superior do tanque ficam resíduos de levedura, produto da formação do *krausen* ou espuma durante a fermentação. Segundo Goode (2010); Goode (2012) e Goode et al. (2013), esses resíduos são classificados como tipo A, sendo resíduos orgânicos/microbiológicos de moderada resistência à remoção.
- b) Nas paredes e no cone do fermentador ficam resíduos de levedura depois do esvaziamento do tanque. São resíduos orgânicos/microbiológicos de fácil remoção. Mas, segundo Salo; Friis e Wirtanen (2008), depois de realizar experimentações com leveduras, concluíram que esses resíduos não podem ser eliminados completamente

somente com água. Esse tipo de resíduos segundo Goode (2010), Goode (2012) e Goode et al., (2013) são classificados como tipo B.

O resíduo tipo A permanece muito mais tempo aderido no tanque; até sete dias a mais do que o tipo B. Durante a verificação das superfícies do tanque não foram observados depósitos minerais. Os parâmetros utilizados no procedimento de CIP na cervejaria para o tanque de fermentação são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Parâmetros do processo CIP atual.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (%; m/m)	Vazão ^a (L/h)
Alcalina	23±1	60	1.3	2500
Enxágue	23±1	5	-	500
Ácida	23±1	60	1.3	2500
Enxágue	23±1	5	-	500
Sanitização	23±1	30	1.0 ^b	2500

^a Medição aproximada baseada no volume e o tempo. ^b v/v.

A temperatura durante todo o processo CIP é 23±1° C (temperatura ambiente). Isso concorda com o estabelecido como uma prática comum para CIP de tanques de fermentação/maturação (STORGARDS, 2000; GOODE, 2012), porém, o processo pode também ser feito a temperaturas maiores (STORGARDS, 2000; GOODE et al., 2010) e com isso obter melhores resultados, como o reportaram Manzano et al. (2011) que empregaram ciclos de pré-enxágue e enxágue a 75° C, e para as soluções alcalinas e ácidas 80° C e 75° C, respectivamente, para processo CIP em micro-cervejaria.

O tempo da recirculação alcalina e ácida tem uma duração de 60 minutos cada, dentro das faixas reportadas por Storgards (2000), porém acima do estabelecido por Manzano et al. (2011), que empregaram uma recirculação alcalina de 20-30 minutos e ácida de 15-20 minutos. Segundo Goode et al. (2010), a recirculação ácida não precisa ser feita toda vez que seja feita a recirculação alcalina. Ao contrário, pode ser estabelecida uma periodicidade dependendo da acumulação de minerais nas paredes do tanque, assim o CIP é simplesmente a recirculação alcalina durante 20-30 minutos. A redução do tempo nesses casos é devido ao uso de temperaturas maiores das soluções.

Os tempos de enxágue estão dentro de faixas reportadas em vários estudos (STORGARDS, 2000; KUNZE, 2006; GOODE et al., 2010; MANZANO et al., 2011), porém o enxágue deve continuar até

garantir a ausência total de resíduos de detergente alcalino ou ácido (KUNZE, 2006).

Atualmente a verificação da remoção apropriada das soluções de limpeza com o enxágue só é feita mediante a percepção do tacto do cervejeiro. Isso traz o risco associado à manipulação de soluções químicas sem proteção e o perigo de deixar resíduos de soluções de limpeza. Kunze (2006) aconselha empregar fitas para medir o pH da água de enxágue que está saindo do tanque e o enxágue deve continuar até obter um pH igual ao valor da água da rede.

A concentração das soluções alcalina e ácida (1,3% m/m) atualmente empregadas concorda com o reportado por Storgards (2000), Boulton; Quain (2001), Jacques; Lyons; Kelsall (2003), Lelieveld; Mostert; Holah (2005) e Tamime (2008). Mas, essas concentrações podem estar acima do necessário, pois os resíduos existentes no tanque não requerem concentrações muito elevadas para serem eliminados (GOODE, 2012).

O processo CIP atual é realizado com duas vazões diferentes, uma para a recirculação das soluções de limpeza (2500 L/h) e outra para os enxágues (500 L/h) isso devido à configuração do sistema existente (ver Apêndice C). Ambas as vazões são insuficientes para obter um CIP apropriado, pois a vazão das soluções deve ser apropriada para permitir a limpeza não só do tanque, mas também das tubulações e acessórios existentes.

Para a limpeza das paredes interiores de tanques, segundo Boulton e Quain (2001), são requeridos $1,5 \text{ m}^3/\text{h}$ por cada metro de circunferência do tanque, ou segundo Goode (2012) $1,5 \text{ L}/\text{m}^2/\text{min}$, requerendo uma vazão aproximada entre 480 L/h e 1500 L/h. Para o caso de tubulações, a vazão mínima requerida é aquela que permita garantir uma velocidade de escoamento de 1,5 m/s (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003; KUNZE, 2006; TAMIME, 2008; GOODE, 2012).

A vazão atual das soluções de limpeza é aproximadamente 2500 L/h, resultando em uma velocidade de 0,6 m/s. A vazão atual é apropriada só para garantir a limpeza do interior do tanque, mas não para garantir a limpeza apropriada das saídas do tanque. A vazão baixa também tem efeito negativo sobre o enxágue, pois atualmente a vazão de aproximadamente 500 L/h não permite um bom espalhamento da água de enxágue nas paredes do tanque. Como pode ser observado na Figura 4.1, não são formados os jatos para atingir as paredes no interior do tanque e a água simplesmente cai como em um chuveiro, deixando nas paredes resíduos das soluções de limpeza.

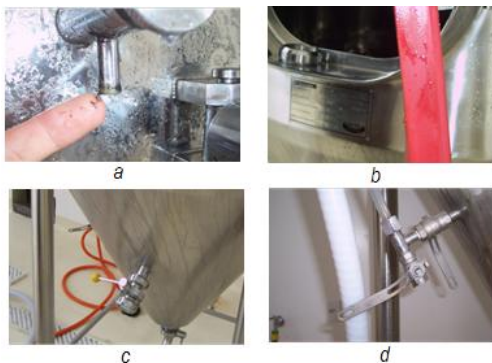
Figura 4.1 Detalhamento do procedimento de enxágue do fermentador, mostrando que os jatos de água do *spray-ball* não atingem as paredes do tanque.



A configuração atual do sistema CIP durante a fase de recirculação dos detergentes ácidos e alcalinos (ver Apêndice C) não permite o esvaziamento total do tanque. Pelo contrário, um volume aproximado de 40 L sempre fica na base do tanque. Assim a remoção dos resíduos que ficam submersos nesse volume é só obtida mediante a difusão dos detergentes nos depósitos. Essa condição não é apropriada para um bom CIP, pois segundo Tamime (2008) e Wilson et al. (2014) depende da ação mecânica obtida pela descida das soluções a remoção dos depósitos nas paredes do tanque. Essas forças são produzidas pela descida das soluções de limpeza espalhadas nas paredes. Assim o sistema atual deve ser redesenhado para permitir o total esvaziamento das soluções de limpeza.

Nem sempre todos os elementos ou acessórios podem ser limpos efetivamente durante o CIP e muitas vezes requiere-se realizar o COP (TAMIME, 2008). Porém atualmente, mesmo que exista um procedimento operacional de limpeza (POP), ele não leva em conta a limpeza de alguns elementos que não podem ser limpos com o CIP, devido à ausência de contato com soluções de limpeza, ausência da força mecânica necessária para remoção (turbulência) ou tempo suficiente para a remoção. Esses elementos são mostrados na Figura 4.2: interior da válvula de amostragens, gaxetas da porta do tanque, válvula de esvaziamento lateral do tanque, válvulas de medidor de nível. Todos esses elementos devem ser inclusos no processo de limpeza mediante um COP e realizar a limpeza com escova ou esponja ou incluí-los, caso possível, no CIP.

Figura 4.2 Detalhamento de dispositivos do tanque de fermentação a ser incluídos no CIP/COP; (a) válvula de amostragem, (b) gaxetas da porta do tanque, (c) saída lateral do tanque, (d) válvulas do medidor de nível.



4.1.3 Qualificação do desempenho

Para a qualificação do desempenho verificou-se a limpeza obtida depois do CIP mediante a medição do ATP.

4.1.3.1 Análise do ATP

Os pontos de amostragem para análise do ATP foram escolhidos segundo as sugestões da EHEDG, pois podem ser locais de acumulação de resíduos.

Os pontos são mostrados na Figura 4.3 e as concentrações de ATP medidas são mostradas na Tabela 4.2.

O uso da medição do ATP como ferramenta de avaliação do processo CIP tem boa correlação com o método tradicional de contagem de placas e tem as vantagens de gerar resultados rápidos (2 minutos), e pode detectar não só resíduos microbiológicos, mas também resíduos orgânicos (STORGARDS, 2000; CLUETT, 2001). Assim, a medição do ATP é reconhecida como uma importante ferramenta para a avaliação e monitoramento da limpeza e desinfecção de equipamentos e processos alimentícios, e está ganhando mais reconhecimento e aplicação (MOORE, G., 2010; KISMARTIN et al, 2013). Porém, o principal limitante do uso do ATP é que não permite a determinação específica do microrganismo contaminante (CLUETT, 2001; GOODE, et al., 2013; SALO; FRIIS; WIRTANEN, 2013).

Figura 4.3 Pontos de coleta de amostras com swab no tanque.

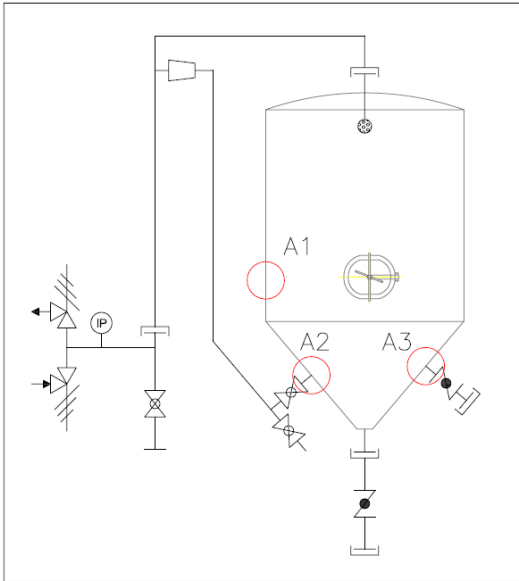


Tabela 4.2 Concentração de ATP (RLU) em pontos críticos do fermentador. Resultados do CIP atual.

Ponto	ATP [RLU] ^a			
	CIP 1	CIP 2	CIP 3	CIP 4
A1	109	33	116	20
A2	40	35	672	123
A3	160	105	389	222

^a Como dado referencial, no ponto A1 antes do processo de limpeza, a análise do ATP forneceu 61298 RLU.

As concentrações de ATP apresentaram muita variabilidade, podendo ser devido ao fato da variabilidade da limpeza inicial feita com a lavadora de jato de água, ou devido ao processo CIP não estar sendo eficiente para remover todos os resíduos. Isso quer dizer que o processo CIP não está sob controle. Os pontos com maior valor de RLU são os mesmos já identificados como os que apresentam deficiências desde o ponto de vista de desenho higiênico.

4.1.3.2 Indicadores chave de desempenho KPIs do CIP

O processo atual de limpeza é do tipo “uso único”, em que todas as soluções de limpeza são descartadas. Essa configuração de CIP é a que gera o maior consumo de químicos e água (TAMIME, 2008). A Tabela 4.3 mostra o consumo de produtos químicos para limpeza e água por ciclo CIP atual. São apresentados os resultados de quatro procedimentos CIP.

Tabela 4.3 Materiais utilizados no procedimento CIP^a.

	CIP 1	CIP 2	CIP 3	CIP 4	Média
Água ^b [L]	290	320	230	300	310
Detergente alcalino [L]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Detergente ácido [L]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

^a Não foi quantificada a água usada com a lavadora de pressão, nem o consumo durante a sanitização. ^b Valores de enxágue atuais.

Os indicadores de desempenho do processo atual de limpeza são mostrados na Tabela 4.4, com base nesses KPIs pode-se gerenciar qualquer modificação no processo.

Tabela 4.4 Indicadores chave de desempenho KPI calculados para o processo CIP atual^a.

KPI	Unidade	Fermentador	<i>Best in class</i> ^b
kWh empregado no CIP/m ³ de cerveja	kWh/m ³	2,42	0,0033
Razão Volume de água empregada no CIP/m ³ de cerveja	m ³ /m ³	0,310	0,0007
Tempo do CIP/m ³ cerveja	min/m ³	130	53

^a Valores para o processo CIP não foi quantificada a água usada com a lavadora de pressão, nem o consumo durante a sanitização. ^b Valores obtidos no ano 2010 segundo Goode (2012).

Os valores dos KPIs atuais do processo CIP estão muito além dos valores obtidos no ano 2010 pelas empresas consideradas as melhores do mercado (*best in class*), segundo Goode (2012). Para o caso do kWh empregado no CIP/m³ de produto produzido, o KPI da micro-cervejaria é 730 vezes maior, e para a razão volume de água empregada no CIP/m³ de produto produzido o KPI da micro-cervejaria é 440 vezes maior. Mesmo que os dados dos KPIs para as melhores empresas (*best in class*)

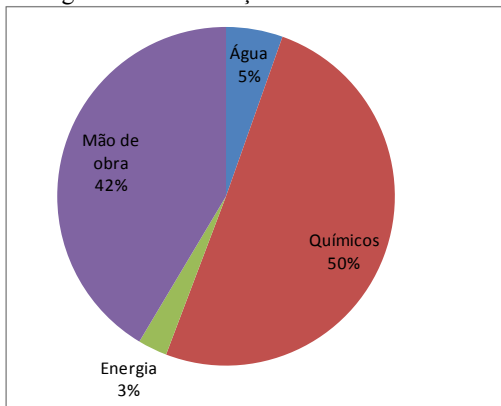
não tenham sido obtidos para micro-cervejarias, evidencia a importância de melhorar os resultados atuais, pois o consumo de energia e água está muito além do sugerido por Goode (2012).

A estrutura dos custos do processo CIP atual é descrita a seguir. Água: 2,36 R\$ (considerando uma tarifa de 7,852 R\$/m³), detergentes químicos: 21,93 R\$ (considerando o valor de 329 R\$ os 30L de detergente), energia elétrica: 1,22 R\$ (considerando o valor do kWh igual a 0.503R\$), mão de obra: 18,06 R\$ (considerando um salário mínimo mensal de 724 R\$ e incorporando benefícios como décimo terceiro e quarto atinge um valor salário mensal total de 2000 R\$), assim o custo total do CIP é 43,57 R\$.

A Figura 4.4 mostra a participação individual dos insumos no CIP. A maior participação dos custos é das soluções de limpeza que representam o 68% do custo total. Esses resultados coincidem com obtidos por Kunze (2006), Goode et al. (2010) e Goode (2012), que demonstraram que os maiores geradores de custos são as soluções de limpeza.

Os custos de mão de obra estão em segundo lugar com o 22%, devido aos tempos de limpeza muito longos (120 minutos). Os custos de energia representam apenas 2% do custo total.

Figura 4.4 Distribuição dos custos do CIP.



Assim, para o caso da micro-cervejaria, esses custos podem ser reduzidos mediante a diminuição do tempo de limpeza e/ou realizar o reuso das soluções. Isso pode ser obtido mediante uma unidade CIP externa (recuperação de soluções) ou mediante uma maior temperatura das soluções (tempos de limpeza mais curtos).

Porém, o reuso de soluções requer o aquecimento das mesmas pelo menos até 44° C e o monitoramento das mesmas para evitar o desenvolvimento de microorganismos que poderiam produzir contaminações cruzadas (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003).

A Tabela 4.5 mostra a variação da concentração das soluções de limpeza antes e depois do CIP. Essa variação é de 0,3% (aprox.) tanto para o detergente alcalino quanto para o ácido.

Tabela 4.5 Variação da concentração das soluções de limpeza^a antes e depois do CIP

CIP	Concentração detergente alcalino % (m/m)		Concentração detergente ácido % (m/m)	
	Antes do CIP	Depois do CIP	Antes do CIP	Depois do CIP
1	1,3	1,0	1,2	0,8
2	1,2	1,0	1,3	1,0
3	1,3	0,9	1,3	0,8
4	1,1	0,8	1,1	0,9
Média	1,2	0,9	1,2	0,9

^a Valores obtidos mediante titulação com fenolfaleína (Anexo C).

Observa-se que a variação é baixa e é possível reutilizar as soluções para serem empregadas em novos processos CIP (TAMIME, 2008). Mas precisa ser instalado um sistema CIP com tanques de recuperação de soluções, pois atualmente todas as soluções são descartadas depois de um único uso.

Para o reuso de soluções, devem ser acondicionadas com as concentrações até o nível referencial (1,3% m/m), adicionando soda concentrada ou ácido concentrado. O volume de soluções de limpeza concentradas requerido para reacondicionar as soluções de limpeza reusadas pode ser de aproximadamente um 10% do volume que é empregado atualmente (baseado na redução da concentração de 0,3%). Isso significa que para cada ciclo de limpeza, pode existir uma economia de 90% no que tem de ver com químicos. Mediante o reuso de soluções podem ser melhorados os KPIs e também produzir economia nos custos do processo CIP.

A unidade CIP externa pode não só permitir a recuperação das soluções de limpeza, mas também pode garantir um bom enxágue depois da limpeza alcalina e ácida, pois a unidade CIP deve contar com um tanque de armazenamento de água para esse objetivo. A redução dos custos do CIP na micro-cervejaria pode ser maior ainda se for feito

o CIP só com recirculação alcalina e eventualmente um CIP com recirculação alcalina combinado com recirculação ácida, devido a que o tipo de depósitos, principalmente orgânicos, requer principalmente limpeza alcalina e, eventualmente, a ácida.

4.2 EXPERIMENTOS DO CIP EM LABORATÓRIO

Os experimentos do processo CIP em laboratório foram feitos para avaliar os quatro fatores ou 4Ts (temperatura, tempo, titulação, turbulência) relevantes para a remoção de um biofilme formado pela bactéria *Acetobacter aceti*.

O processo CIP foi caracterizado quanto à contagem de UFC recolhidas do biofilme das placas de prova (UFC/cm²), redução logarítmica da contagem (*R log*), valor da concentração do ATP quantificado mediante RLU/cm², e a redução logarítmica da quantidade de ATP em termos da redução logarítmica da RLU (*R logRLU*), depois de um processo de limpeza CIP de 3 minutos.

A tabela 4.6 apresenta a matriz de planejamento fatorial completo 2³, com os valores iniciais das variáveis em termos unidades formadoras de colônias UFC/cm² e a concentração de ATP medido em RLU/cm² para as placas de prova posicionadas na parte superior e inferior do tanque, submetidas a um processo CIP durante 3 minutos.

A tabela 4.8 mostra também que a maior remoção do biofilme (maior redução logarítmica) foi obtida quando usando soluções de limpeza com maior temperatura e maior concentração alcalina (ensaio 3). Esse ensaio permitiu a remoção do 99,98% do biofilme.

Os resultados da remoção do biofilme representados mediante a redução logarítmica apresentados na Tabela 4.8 foram tratados estatisticamente onde os efeitos absolutos estão apresentados nas Figuras 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10 mediante os diagramas de Pareto.

Tabela 4.6 Matriz de planejamento fatorial completo 2³, com os valores iniciais das variáveis em termos das UFC/cm² e a concentração de ATP medido em RLU/cm² para as placas de prova superior e inferior, após um CIP de 3 min.

Ensaio	T (°C)	C (m/m)	Q (l/min)	Controle		Placa superior		Placa inferior	
				UFC/cm ²	RLU/cm ²	UFC/cm ²	RLU/cm ²	UFC/cm ²	RLU/cm ²
1	26	0,00	11	34375,0	416,25	27343,75	115,63	31250,00	187,00
2	34	0,00	11	32812,5	406,25	3906,25	27,19	4218,75	74,19
3	26	0,10	11	33450,0	423,06	1718,75	3,25	1875,00	41,06
4	34	0,10	11	40145	416,25	2968,75	6,87	2500,00	33,19
5	26	0,00	15	28125,0	342,75	6562,5	29,69	6562,50	96,56
6	34	0,00	15	35625,0	451,94	3750,00	29,25	4218,75	75,37
7	26	0,10	15	34375,0	440,19	4218,75	23,37	3750,00	61,62
8	34	0,10	15	34650,0	429,19	2500,00	4,69	2343,75	25,75
9	30	0,05	13	37500,0	533,94	3593,75	21,87	3750,00	69,50
10	30	0,05	13	35937,5	452,69	5625,00	12,44	5000,00	79,44

Os valores correspondentes às UFC representam a média de duas contagens. Para o caso do ATP, foi uma medição única. Algarismos significativos fornecidos pelo equipamento.

T representa temperatura, C a concentração e Q a vazão.

Tabela 4.7 Respostas em termos de redução logarítmica das UFC/cm² (*R log*) e redução logarítmica da RLU (*R logRLU*) para a placa posicionada na parte superior e inferior do tanque depois de um processo CIP de 3 minutos.

Ensaio	Placa superior				Placa inferior			
	<i>Redução logarítmica UFC/cm2</i>		<i>Redução logarítmica RLU/cm2</i>		<i>Redução logarítmica UFC/cm2</i>		<i>Redução logarítmica RLU/cm2</i>	
	<i>R log</i>	<i>R logRLU</i>	<i>R log</i>	<i>R logRLU</i>	<i>R log</i>	<i>R logRLU</i>	<i>R log</i>	<i>R logRLU</i>
	Expe- rimen- tal	Mode- lo ^a	Expe- rimen- tal	Mode- lo ^a	Expe- rimen- tal	Mode- lo ^a	Expe- rimen- tal	Mode- lo ^a
1	0,1	0,11	0,56	0,58	0,04	0,05	0,35	0,35
2	0,92	0,93	1,17	1,19	0,89	0,90	0,74	0,74
3	1,29	1,30	2,11	2,13	1,25	1,26	1,01	1,01
4	1,12	1,13	1,78	1,80	1,21	1,22	1,1	1,10
5	0,63	0,64	1,06	1,08	0,63	0,64	0,55	0,55
6	0,98	0,99	1,19	1,21	0,93	0,94	0,78	0,78
7	0,91	0,92	1,27	1,29	0,96	0,97	0,85	0,85
8	1,13	1,14	1,96	1,98	1,17	1,18	1,22	1,22
9	1,02	0,89	1,39	1,41	1	0,89	0,89	0,82
10	0,81	0,89	1,56	1,41	0,86	0,89	0,76	0,82

^a Os modelos empíricos da remoção do biofilme são apresentados no Apêndice D.

Para o caso da placa superior, os diagramas de Pareto (Figura 4.5 e Figura 4.6) da redução logarítmica das UFC/cm² (*RLog*) e redução logarítmica *RLogRLU* (RLU/cm²) demonstram que a concentração de hidróxido de sódio apresenta um efeito positivo significativo ($p < 0,05$) sobre a remoção do biofilme formado na placa, cujo incremento conduz a uma maior remoção. Ao contrário, a vazão apresentou um efeito positivo não significativo sobre a remoção do biofilme da placa posicionada na parte superior do tanque.

Figura 4.5 Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis: concentração de hidróxido de sódio, temperatura e vazão, bem como as interações entre essas variáveis, na redução logarítmica das UFC/cm² ($p < 0,05$) para a placa posicionada na parte superior do tanque.

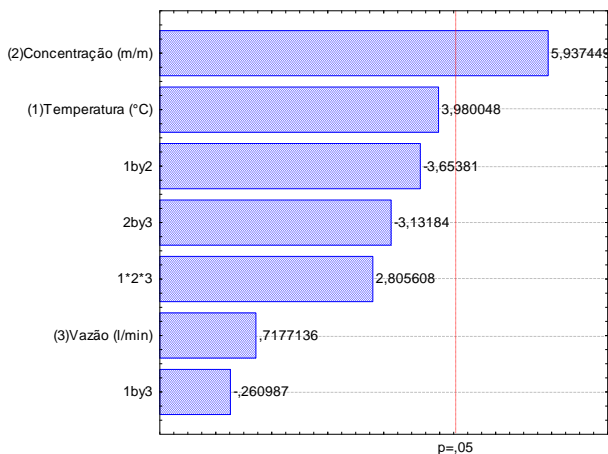
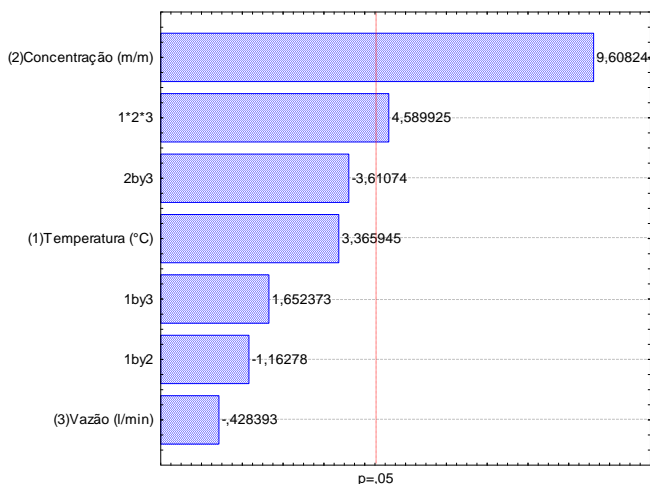


Figura 4.6 Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis: concentração de hidróxido de sódio, temperatura e vazão, bem como as interações entre essas variáveis, na redução logarítmica das RLU/cm² ($p < 0,05$) para a placa posicionada na parte superior do tanque.



A relevância do fator concentração sobre os outros fatores pode ser devido ao fato que foi escolhido como nível inferior (-) a concentração 0%. O efeito positivo do incremento da concentração do hidróxido de sódio na remoção do biofilme concorda com os resultados obtidos por Kumari e Sarkar (2014), que determinaram que o aumento da concentração de hidróxido de sódio de 1% a 1,5% aumentou a remoção do biofilme de *Bacillus cereus* em 31% mantendo a temperatura constante.

Para o caso da redução logarítmica da RLU (Figura 4.6), resultou relevante também a interação entre os três fatores avaliados. Os parâmetros vazão e temperatura não apresentaram efeitos significativos possivelmente devido à influência que tem a geometria do tanque no espalhamento das soluções. Tamime (2008) e Wilson et al., (2014) descrevem que em tanques verticais a limpeza é obtida pelo espalhamento das soluções nas paredes e a descida das mesmas. Para o caso de tanques com diâmetros muito pequenos pode acontecer que os jatos das soluções atingem as paredes com muita força e não consegue se formar uma película de soluções para remover o biofilme (TAMIME, 2008). Também as placas de prova mesmo que sendo pequenas (40x40 mm) não conseguem seguir o contorno circular da parede do tanque, assim quando a vazão é incrementada não é possível formar uma película de soluções igual á obtida na parede do tanque. Por essa razão, os resultados relacionados com a limpabilidade de superfícies obtidas de ensaios feitos em laboratório devem ser avaliados com precaução, pois recriar condições de operação reais é muito difícil (STORGARDS, 2000).

Para o caso da placa inferior, os diagramas de Pareto (Figura 4.7 e Figura 4.8) da redução logarítmica das UFC/cm² (*RLog*) e redução logarítmica *RLogRLU* (RLU/cm²) demonstram que a concentração de hidróxido de sódio e a temperatura apresentam um efeito positivo significativo ($p < 0,05$) sobre a remoção do biofilme formado na placa, cujo incremento conduz a uma maior remoção. Ao contrário, a vazão apresentou um efeito não significativo positivo sobre a remoção do biofilme da placa posicionada na parte inferior do tanque.

O efeito positivo da concentração e temperatura para a remoção do biofilme aderido à placa posicionada na parte inferior do tanque pode ser explicado assim: devido à placa ficar submersa, a remoção do biofilme é obtida principalmente por efeito de difusão, pois não existe a ação mecânica das forças de fluxo e o efeito positivo da difusão é favorecido pelo incremento da temperatura.

Figura 4.7 Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis: concentração de hidróxido de sódio, temperatura e vazão, bem como as interações entre essas variáveis, na redução logarítmica das UFC/cm² ($p < 0,05$) para a placa posicionada na parte inferior do tanque.

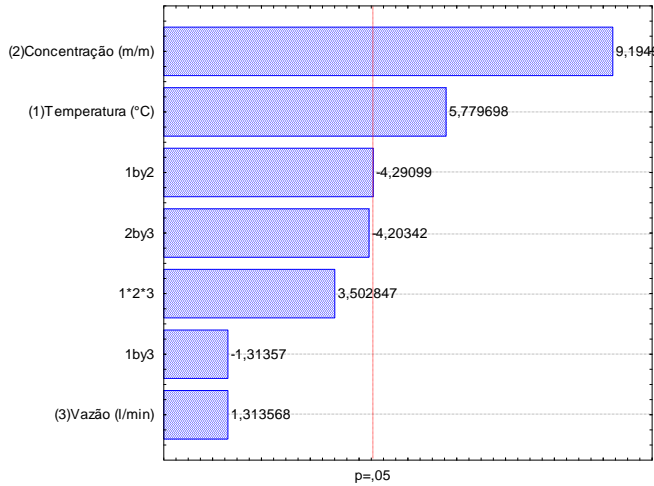
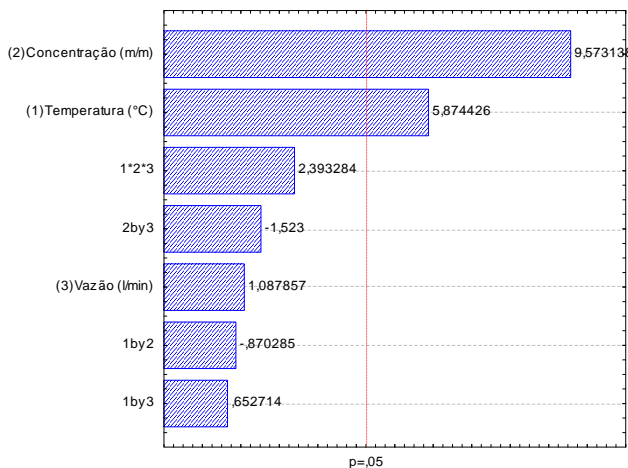


Figura 4.8 Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis concentração de hidróxido de sódio, temperatura e vazão, bem como as interações entre essas variáveis, na redução logarítmica das RLU/cm² ($p < 0,05$) para a placa posicionada na parte inferior do tanque.



Esse efeito foi avaliado por Ji Yeon Yoo et al. (2006), que analisaram a cinética da remoção de cubos de gel de proteína de leite em soluções alcalinas sob condições de convecção natural e convecção forçada, e acharam que um aumento na concentração e temperatura das soluções alcalinas em condições de convecção natural favorece a dissolução dos cubos de gel.

Existe concordância entre os valores obtidos para a avaliação da remoção do biofilme mediante a contagem em placas Petri e os resultados obtidos com a quantificação do ATP mediante a medição da RLU, esses resultados concordam com os obtidos por Storgards (2000) que avaliou diferentes micro-organismos degradadores de cerveja aderidos às superfícies de equipamentos de processo e dispensadores de cerveja. Também Miller; Miller e Glasgow (1998), Moore et al. (2010) acharam uma alternativa viável à detecção de micro-organismos mediante o uso do ATP, especificamente eles testaram diferentes cepas de lactobacilos e leveduras e todos eles foram detectados facilmente.

Devido às vantagens que oferece a verificação da limpeza mediante a quantificação do ATP, isso é: resultados em minutos, simplicidade de uso, pouco treinamento requerido para o uso dos equipamentos, etc., a quantificação do ATP (mediante a medição das RLU) tem se mostrado como uma ferramenta muito valiosa para avaliação dos processos CIP na indústria especialmente na cervejeira (MILLER; MILLER; GLASGOW, 1998; STORGARDS, 2000; TAMIME, 2008; MOORE et al., 2010), deixando o método tradicional de cultura e contagem em placas principalmente quando se requer informação sobre os micro-organismos contaminantes.

5. CONCLUSÕES

- a) A metodologia para validação do CIP proposta pela EHEDG permitiu obter evidência documentada das condições atuais do processo CIP de um fermentador (avaliar) e sugerir correções para garantir um CIP apropriado (melhorar).
- b) A metodologia da EHEDG permitiu verificar de uma forma integral e sequencial não só os quatro fatores: temperatura, tempo turbulência, titulação, mas também permitiu verificar dois fatores adicionais: tecnologia e treinamento do processo CIP do fermentador.
- c) Erros de desenho higiênico de equipamentos e instalações (pontos mortos) foram identificados no fermentador da microcervejaria, como um problema recorrente. Esses pontos devem ser eliminados para permitir um processo CIP eficaz e eficiente.
- d) As condições atuais do processo CIP do fermentador da microcervejaria: temperatura: 24 °C (ambiente), titulação: 1,3% (m/m) estão dentro das faixas aconselhadas.
- e) A vazão atual mantida em dois níveis: 500-2500 L/h está fora do necessário e não pode gerar as forças mecânicas necessárias para a remoção de resíduos ou soluções de limpeza.
- f) O tempo total atual empregado para o processo CIP do fermentador (120 minutos) é considerado longo, pois são empregadas soluções de limpeza a temperatura ambiente, incrementando os custos associados (mão de obra, energia).
- g) Os detergentes alcalinos e/ou ácidos são o principal componente dos custos do processo CIP do fermentador, representam 50,3% do custo total.
- h) Os KPIs do desempenho do processo CIP do fermentador mostram que se requer aprimorar a eficiência do processo, pois atualmente o consumo de água e energia em cada processo CIP por metro cúbico de cerveja produzido (310 litros e 2,42 kWh, respectivamente), são aproximadamente 700 e 400 vezes maior, do que o usado por empresas cervejeiras no exterior.

- i) A quantificação do ATP é uma alternativa apropriada às metodologias tradicionais para realizar a verificação do nível de limpeza do fermentador da microcervejaria depois do CIP.
- j) A existência de unidades CIP ou equipamentos para realizar CIP não garantem resultados apropriados, precisa ser feita uma validação para verificar se os resultados obtidos com as condições atuais são apropriados.
- k) Unidades de limpeza CIP que permitem a recuperação e reuso de soluções de limpeza, são uma boa alternativa que permite garantir um CIP eficaz e reduzir a quantidade de detergentes e água usadas, porém precisam monitoramento do nível microbiológico das soluções reusadas.
- l) Para os experimentos do CIP em laboratório os fatores relevantes foram principalmente a concentração de hidróxido de sódio e temperatura, pois permitiram a remoção 94,86% do biofilme.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Realizar a validação do CIP após realizar as modificações sugeridas: eliminar os pontos mortos, incrementar o fluxo e incorporar tanques para permitir o reuso de soluções de limpeza e água.
- Realizar estudos sobre o consumo de água e energia em microcervejarias para calcular KPIs e obter dados referenciais locais para avaliar a eficiência dessas unidades produtivas.
- Avaliar KPIs de processo de limpeza do fermentador obtidos mediante o uso de soluções de limpeza a temperaturas maiores do que a temperatura ambiente.
- Realizar a validação do CIP de outros processos ou linhas na indústria cervejeira.
- Realizar estudos sobre o desenho higiênico, pois erros no desenho higiênico produzem CIP ineficiente, aumentando custos diretos e indiretos.

REFERÊNCIAS

APIC, **Guide to Cleaning validation in active pharmaceutical ingredients manufacturing plants APIC**. 2014 disponível em <http://www.apic.cefic.org/publications.html> Acesso 18 fevereiro 2014.

BARATA, A.; MALFEITO, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 243-259, 2012.

BARTH-HASS. Beer Production: Market Leaders and their Challengers. **The Barth-Haas Group and German Hansmaennel online**, p.2-16, 2013.

BLASCHEK, H.; WANG, H.; AGLE, M. **Biofilm in the food environment**. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2008.

BOULTON, C. **Encyclopedia of brewing**. Oxford: John Wiley, 2013.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yeast & Fermentation**. Oxford: Blackwekk, 2001.

BRASIL. Decreto n. 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

BRIGGS, D. et al. **Brewing Science and practice**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2000.

BUCKEE, G.; BARRETT J. Effect of wort-evaporation on flavour and other beer qualities. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 88, p 329-331. 1982.

CLARK, Peter. **Case Studies in Food Engineering: Learning from Experience**. New York: Springer, 2009.

CLUETT, J. **Cleanability of certain stainless steel surface finishes in the brewing process**. 2001. 159f.. Dissertation (Magister Philosophiae). Faculty of Mechanical, Rand Afrikaans University, South Africa, 2001.

HAIDER, SYED, **Pharmaceutical master validation plan: the ultimate guide to FDA, GMP, and GLP compliance**, Boca Raton: CRC Press, 2002.

HILBERT, L., et al. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p 175-185, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS. **CAC/RCP 1-1969**: General principles of food hygiene. Geneva, 2003. 31p.

DICKENSON, C. **Valves, piping and pipelines handbook**. Oxford: Elsevier Science, 1999.

DIN Deutsches Institute für Normung. **Getränkeschankanlagen- Teil 4**: Hygieneanforderungen an Bau-und Anlagenteile, DIN 6650-4. Berlin, 2006. p. 9.

EHEDG. **Doc. 8 Hygienic equipment design criteria**, 2.ed. Brussels: Campden & Chorleywood Food Research Association Group, 2004a.

EHEDG. **Doc. 13 Hygienic design of equipment for open processing**, Brussels: EHEDG, 1996.

EHEDG. **Doc. 14 Hygienic requirements of valves for food processing**, Brussels: Campden & Chorleywood Food Research Association Group, 2004b.

EUROPEAN UNION. **EU Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use**: Annex 15. Qualification and Validation. Bruxelles, 2001. 11p.

FDA. **Guide to inspections validation of cleaning processes**. Maryland, 2014 disponível em <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074922.htm>. Acesso em: 15 dezembro 2014.

FDA. **Good Manufacturing Practices (GMPs) for the 21st Century - Food Processing**, 2013 disponível em <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/CGMP/ucm110877.htm>. Acesso em: 04 abril 2014.

FRYER, P.; HASTING, A.; JEURNINK, J. **Fouling and cleaning in food processing: Proceedings of a conference held at Jesus College, Cambridge 23 to 25 March 1994**. Brussels: European Commission, 1996.

GUIA TRABALHISTA. Tabela dos valores nominais do salário mínimo, 2014. Apresenta os valores nominais do salário mínimo por horas. Disponível em: <http://www.guiatrabalhista.com.br/>. Acesso em: 25 novembro 2014.

GOODE, K. **Characterising the cleaning behaviour of brewery foulants. To minimise the Cost of Cleaning In Place Operations**. 2012. 311f.. Thesis (Doctor of Engineering). College of Engineering and Physical Sciences, University of Birmingham, Birmingham, 2012.

GOODE, K. et al. Characterising the cleaning mechanisms of yeast and the implications for Cleaning In Place (CIP). **Journal of Food and Bioproducts processing**, 88, p 365-374, 2010.

GOODE, K. et al. Fouling and Cleaning Studies in the Food and Beverage Industry Classified by Cleaning Type. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 12, p 121-143, 2013.

GÖRANSSON, A.; PETERSSON, K. A systematic approach to food safety. **Journal of Hygienic Engineering**, v. 52, p 175-185, 2003.

HILBERT, L. et al. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.13, p 990-1011, 2014

HELDMAN, D.; LUND, D. **Handbook of Food Engineering**. Florida: CRC Press, 2007.

HUI, Y. **Handbook of food science, technology and engineering**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

International Organization for Standardization. **ISO 14159: 2002 (E): Safety of machinery — Hygiene requirements for the design of machinery**. Geneva: 2002. 30p.

JACQUES, K.; LYONS, T.; KELSALL, D. **The alcohol textbook**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003.

JAHID, I.; HA, S. The Paradox of Mixed-Species Biofilms in the Context of Food Safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p 990-1011, 2014

JENSEN, B. **Hygienic Design of closed Processing Equipment by use of Computational Fluid Dynamics**. Denmark: BioCentrum-DTU, 2002.

JENSEN, B.; STENBY, M.; NIELSEN, D. Improving the cleaning effect by changing average velocity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. s52-s53, 2007.

JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 139-155, 1996.

JI YEON YOO et al. Dissolving heat-induced protein gel cubes in alkaline solutions under natural and forced convection conditions. **Journal of food engineering**.v. 79, p. 1315-1321, 2007.

KISMARTIN, I. et al. Control of HACCP system efficiency in cream cheese production. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 2, p. 30-35, 2013.

KUMAR, G.; ANAND, S.K., Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 42, p. 9-27, 1998.

KUMARI, S.; SARKAR, K. In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. **Journal of Food Control**. v. 36, p. 153-158, 2014.

KUNZE, W. **Tecnología para cervceros y malteros**. 1.ed. Berlín: VLB Berlin, 2006.

LELIEVELD, H.; MOSTERT, T.; HOLAH, J. **Handbook of hygiene control in the food industry**. Cambridge: CRC, 2005.

LELIEVELD, H.; MOSTERT, T.; WHITE, B. **Hygiene in food processing: Principles and practice**. Cambridge: CRC, 2001.

LELIÈVRE et al. Modelling of cleaning kinetics of pipes soiled by bacillus spores assuming a process combining removal and deposition, **Trans IChemE**, v. 80, p 305-311, 2002.

MAIFRENI, M. et al. Bacterial biofilm as a possible source of contamination in the microbrewery environment. **Food Control**, v.10, p 163-167, 2014.

MANZANO, M., et al. Craft beer microflora identification before and after a cleaning process. **Journal of the institute of brewing**, v. 117, p. 343-351, 2011.

MESHKOVA, F. Hygienic aspects of food processing in the food industry "Swisslion". **Journal of Hygienic engineering and design**, v. 1, p 197-200, 2012.

MILLER, B; MILLER, R.; GLASGOW, G. Rapid methods for the detection of yeast and lactobacillus by ATP bioluminescence. **Journal of Institute of brewing**, vol. 95, p. 317-319, 1989.

MOORE, G. et al., The use of adenosine triphosphate bioluminescence to assess the efficacy of a modified cleaning program implemented within an intensive care setting. **American Journal of Infection Control**, p. 617-622, 2010.

MYSZKA, K.; CZACZYK, K. Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**. v. 61, n. 3. p.173-180, 2011.

NICOLAY, L.; SCHMITT, R. Cleanability of equipment: a prerequisite for the validation of cleaning in the food industry. **EHEDG European Hygienic Engineering & Design Group Yearbook 2011/2012**, Frankfurt: VDMA Verlag GmbH, p 45-48, 2012.

NIKOLEISKI, D. Principles of hygienic design. **Journal of Journal of Hygienic engineering and design**, v. 1, p 15-18, 2012.

NOBILE, C.; MITCHELL, A. Microbial biofilms: e pluribus uem um. **Current Biology**, v.17, p 349-353, 2007.

NSF International. **Food Equipment Materials**, ANSI/NSF 51. Michigan, 1997. p. 17.

PARTINGTON, E. Materials of construction-the role of stainless steels. **Journal of Hygienic engineering and design**, v. 1, p 27-30, 2012.

PRIEST, F.; STEWART, G. **Handbook of brewing**. Florida: CRC, 2006.

RHOADES. The Herfindahl-Hirschman Index. **Federal Reserve Bulletin**. p. 188-189, 2001.

RISTOVSKA, et al. Microbiological safety of food products in republic of Macedonia for the period 2001-2009. **Journal of Hygienic engineering and design**, v. 1, p 101-104, 2012.

SAKAMOTO, K.; KONINGSB, W. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 105-124, 2003.

SALA, C. et al. Establishing the microbial contamination of surfaces from the food industry by alternative methods using atp bioluminescence. **Lucrări stiinfice medicină veterinară**, v. 61, p 841-846, 2008.

SALO, S.; FRIIS, A.; WIRTANEN, G. Cleaning validation of fermentation tanks. **Journal of food and bioproducts processing**, v. 86, p 204-210, 2008.

SALO et al. Validation of the Microbiological Methods Hygicult Dipslide, Contact Plate, and Swabbing in Surface Hygiene Control: A Nordic Collaborative Study. **Journal of AOAC international**, v. 83, n. 6, p. 1357-1366, 2000.

SANNI, A. et al. Microbial deterioration of traditional alcoholic beverages in Nigeria. **Food Research International**, v.32, p 163-167, 1999.

SCHEFFLER, R. Preventive measures to reduce the risk of cross contamination on direct food contact surfaces of conveyor belts. **Journal of Hygienic engineering and design**, v. 5, p 3-5, 2012.

SEBRAE. **Cachaça artesanal. Relatório completo**. Brasília: 2013.

SINDICERV. **Mercado**. Dados estatísticos da indústria cervejeira no Brasil. Disponível em: < <http://www.sindicerv.com.br/mercado.php>>. Acesso em: 8 fevereiro 2014.

SMIT, G. **Dairy processing: Maximizing Quality**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003.

STEFENON, R. Sustainable Competitive Advantages in the Brewing Industry: the Case of Specialty Beers. **Revista Capital Científico-Eletrônica Capital**, 2012.

STORGÅRDS, E. **Process hygiene control in beer production and dispensing**. Finland: VTT technical research centre of Finland, 2000.

SUVARNA, K., et al. Case Studies of Microbial Contamination in Biologic Product Manufacturing. **American Pharmaceutical Review**, [-], p. 50-56, 2011.

TAMIME, A. **Cleaning-in-Place: Dairy, Food and Beverage Operations**. 3.rd. Oxford: Blackell Publishing, 2008.

TIMMERMAN, H. Planet versus profit; sustainable energy solutions cleaning & disinfection. **Journal of Hygienic engineering and design**, v. 1, p 217-223, 2012.

TIMMERMAN, H. Practical considerations for cleaning validation. **EHEDG European Hygienic Engineering & Design Group Yearbook 2013/2014**, Frankfurt: VDMA Verlag GmbH, p 84-86, 2014.

USDA United States Department Of Agriculture. **Guidelines for the sanitary design and fabrication of dairy processing equipment**. Washington, 2001. p. 54.

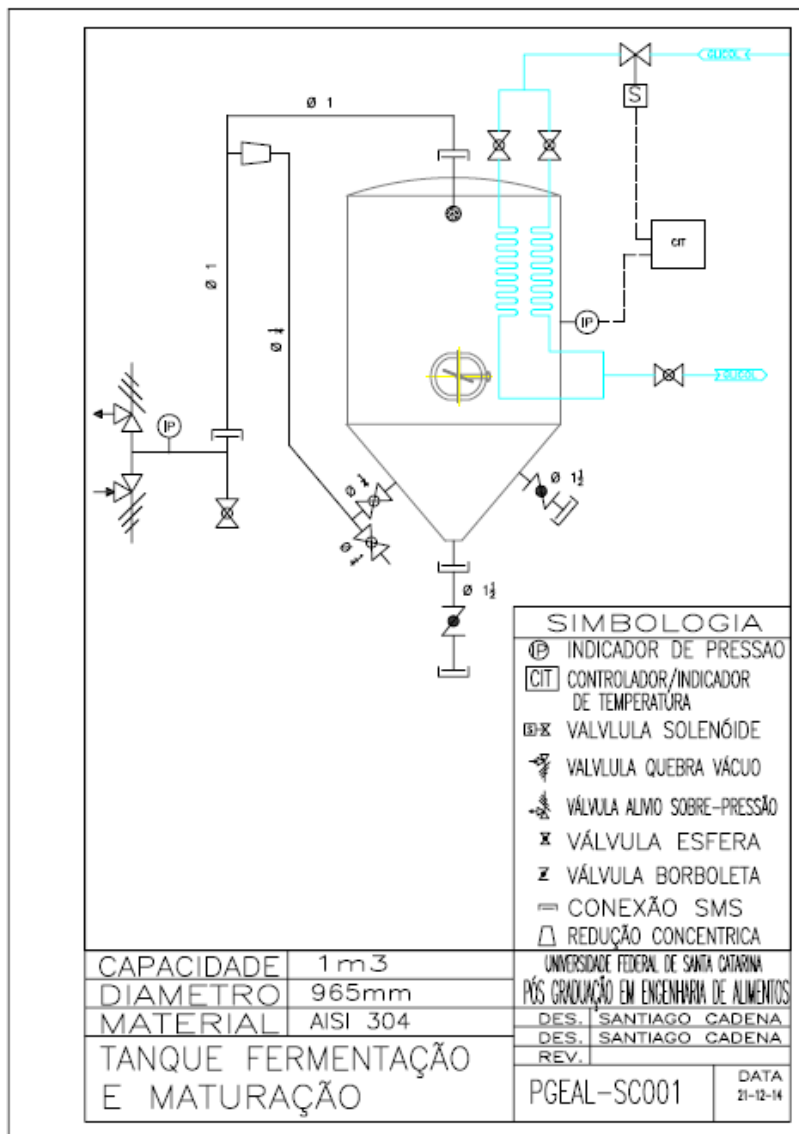
WALID, et al. Cleanability study of a Scraped Surface Heat Exchanger. **Journal of food and Bioproducts Processing**, v. 91, p 95-102, 2013.

WALSTRA, P., et al. **Dairy Technology**. 2.ed. New York: Marcell Dekker, 1999.

WILSON, D., et al. Cleaning of soft-solid soil layers on vertical and horizontal surfaces by stationary coherent impinging liquid jets. **Journal of Chemical Engineering science**, v. 109, p. 183-186, 2014.

APÊNDICE A

Figura A1. Diagrama P&I do tanque fermentador na micro-cervejaria

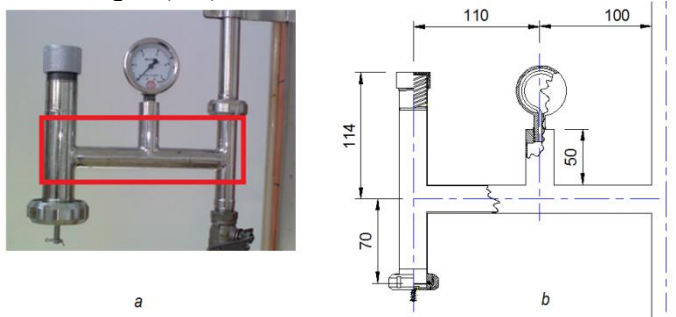


APÊNDICE B – Não conformidades de desenho higiênico no tanque fermentador

As não conformidades relacionadas com o desenho higiênico precisam ser corrigidas para poder garantir uma boa limpeza, pois, o desenho higiênico de equipamentos é fundamental para evitar contaminações e produzir alimentos seguros (NICOLAY; SCHMITT, 2012). A seguir descrevem-se as não conformidades encontradas no tanque fermentador.

1. **Ponto de medida de pressão:** na figura B.1 é mostrado o ponto relativo ao Tee muito comprido para conectar o manômetro e as válvulas de alívio. Nesse local podem se acumular soluções de limpeza/água. Na Figura B.1 (b) são indicadas as dimensões do local.

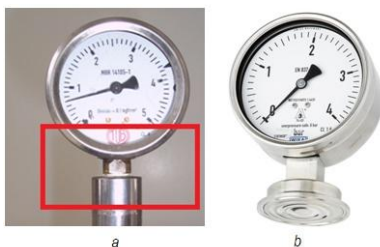
Figura B.1 Detalhamento do Tanque de Fermentação a) Fotografia do Tee, b) Medidas da região (mm).



O documento 8 da EHEDG (2004) sugere que devem ser evitados pontos mortos onde resíduos ou micro-organismos possam se acumular. Levando em conta isso, deve ser reduzido o comprimento da tubulação e também produzir uma inclinação para garantir o *self-draining* e não permitir a acumulação de água ou soluções de limpeza.

2. **Encaixe do manômetro:** o material do encaixe é inadequado para ficar em contacto com soluções de limpeza, pois o latão não é inerte. Também o encaixe tipo rosca e o princípio de funcionamento do manômetro (tubo Bourdon) irão permitir que soluções de limpeza, água e/ou micro-organismos possam ficar dentro do mesmo.

Figura B.2 Detalhe do manômetro acoplado ao tanque de fermentação a) Fotografia do manômetro atual b) Imagem de manômetro com desenho sanitário^b.

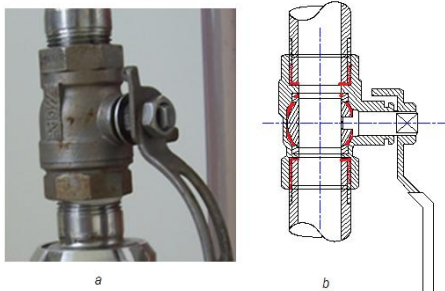


^b manômetro marca wika, fonte: www.wika.com.br

O mesmo documento 8 da EHEDG (2004) diz que devem ser empregados materiais que não possam reagir com os alimentos ou soluções de limpeza. Também indica que acoplamentos tipo rosca e espaços ou buracos devem ser eliminados, pois permitem a acumulação de resíduos ou micro-organismos. Levando em conta tudo isso, se sugere trocar esse tipo de manômetro por outro fabricado com materiais apropriados, cumprindo exigências do desenho higiênico.

3. Válvulas tipo esfera empregadas no medidor de nível e na tubulação para CIP: esse tipo de válvula apresenta uma região que nunca entra em contato com as soluções de limpeza e conseqüentemente pode permitir o desenvolvimento de micro-organismos. Também a junção do tipo rosca, bastante comum nessas válvulas gera espaços ou fendas onde se podem abrigar resíduos ou micro-organismos, esses locais não permitem o fluxo livre de soluções de limpeza.

Figura B.3 Detalhe da válvula de alimentação de CIP do tanque de fermentação. a) Fotografia de válvula tipo esfera, b) Regiões da válvula tipo esfera onde há acumulação de resíduos.



As válvulas usadas em processos alimentícios devem permitir a livre troca ou movimentação dos fluidos durante o processo de produção ou limpeza, devem garantir que não fiquem espaços onde possam se acumular resíduos; Também como já foi dito, não se deve usar acoplamentos tipo rosca (EHEDG, 2004). Levando em conta isso, as válvulas de esfera devem ser trocadas por outras com desenho higiênico, por exemplo, válvulas de esfera sanitárias ou tipo borboleta que não permitem a acumulação de resíduos no seu interior, disponíveis no mercado.

4. **Acabamento superficial:** no interior do tanque observou-se o acabamento superficial apresenta soldagens irregulares (Figura B.4) que permitem a acumulação de resíduos e podem favorecer o crescimento de micro-organismos.

Figura B.4 Detalhe da parte interna do fermentador. Fotografia do acabamento superficial das soldagens.



Segundo a EHEDG, documento 13 (1996), o acabamento superficial mínimo requerido é de $0.8 \mu\text{m}$. Assim toda superfície em contato com o produto deve ser suave, contínua e livre de defeitos, fendas, ranhuras ou irregularidades, mesmo nas linhas que não estejam em contato com produto devem ter um bom acabamento superficial. As superfícies devem ser polidas até obter uma rugosidade superficial de $0.8 \mu\text{m}$.

5. **Indicador de nível tipo “mangueira”:** esse dispositivo presente no equipamento (Figura B.5 a), e detalhado na figura B.5 (b) está fora dos padrões de desenho higiênico, pois durante o processo de fermentação esse aparelho fica cheio de cerveja e leveduras, produzindo a

acumulação de resíduos nos pontos mortos nas suas conexões (Figura B.6).

Figura B.5 Detalhe do medidor de nível do tanque de fermentação. a) Fotografia do medidor de nível tipo mangueira, b) Diagrama do medidor.

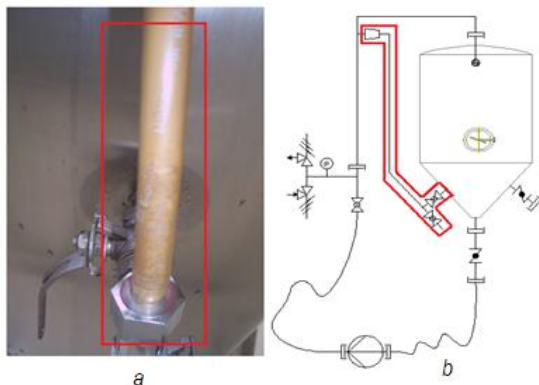
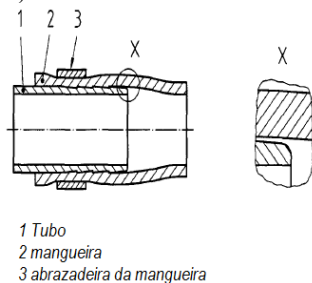


Figura B.6 Detalhe do ponto morto existente nas conexões com mangueira (Adaptado de DIN 6650-4).



Para eliminar os pontos mortos de este acessório sugere retirar o medidor e usar um medidor de nível com desenho sanitário, por exemplo, sensor de nível por ultrassom, galgas extensiométricas, etc.

APÊNDICE C – Procedimento do CIP do tanque de fermentação

As etapas do procedimento de higienização do tanque de fermentação (Figura C.1) são:

Pré-enxágue: Mediante uma lavadora de alta pressão, o cervejeiro realiza a remoção da sujeira grossa. Esta operação é feita durante aproximadamente 5-10 minutos e consegue remover quase toda a sujeira visível.

Recirculação alcalina: A bomba de recirculação é posicionada segundo a Figura C.1 (a), a sucção da bomba conectada à linha de água potável e a descarga da bomba é conectada à linha de limpeza do tanque, com 50l de solução de limpeza alcalina KALYCLEAN C 272 (2% v/v), cujas especificações são mostradas no Anexo A. Para dar início à recirculação a sucção da bomba é conectada à saída inferior do tanque segundo a Figura C.1 (b) e a recirculação é feita durante 60 minutos.

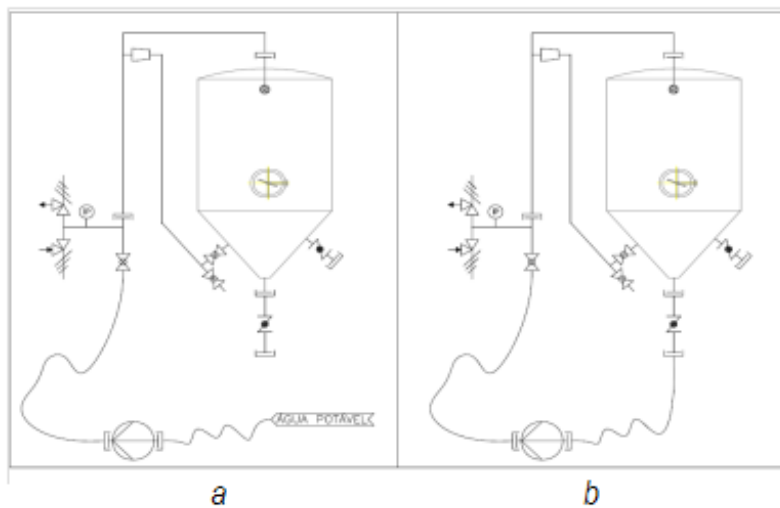
Enxágue: Depois do tempo de recirculação a solução alcalina é descartada, novamente a linha de água é conectada à sucção da bomba (Figura C.1a) e começa o enxágue durante 5 minutos, a água de enxágue é jogada diretamente ao cano.

Recirculação ácida: A bomba de recirculação é posicionada segundo a Figura C.1 (a), a sucção da bomba conectada à linha de água potável e a descarga da bomba é conectada à linha de limpeza do tanque, com 50 L de solução de limpeza ácida KALYCLEAN A 691 (2% v/v), cujas especificações são mostradas no Anexo B. Para dar início à recirculação a sucção da bomba é conectada à saída inferior do tanque segundo a Figura C.1 (b) e a recirculação é feita durante 60 minutos.

Enxágue: Depois do tempo de recirculação estabelecido, a solução ácida é jogada para o cano, novamente a linha de água é conectada à sucção da bomba (Figura C.1 (a)) e começa o enxágue durante 5 minutos, a água de enxágue é descartada.

Sanitização: A bomba de recirculação Figura C.1 (a) é conectada à linha de água potável e a descarga da bomba é conectada à linha de limpeza do tanque com 50 L de ácido de per acético (1% v/v). Para dar início à recirculação, a sucção da bomba é conectada à saída inferior do tanque Figura C.1(b) e a recirculação é feita durante 30 minutos.

Figura C.1 Diagrama de fluxo do processo CIP atual, a) enchimento/enxágue b) recirculação.



APÊNDICE D – Modelos de análise de regressão para os experimentos do CIP em laboratório

A análise estatística dos resultados da Tabela 4.7 permitiu a construção de os modelos empíricos da remoção do biofilme em função da concentração de hidróxido de sódio (C), temperatura (T) e vazão (V) para as placas posicionadas na parte superior e inferior do micro tanque e submetidas ao processo CIP no laboratório durante 3 minutos. Os modelos empíricos foram avaliados estatisticamente para um nível de confiança 95% e os fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) são apresentados a seguir:

Placa Superior:

$$\text{Redução logarítmica das células do biofilme / cm}^2 = 0,891 + 0,228 * C \quad (\text{D.1})$$

$$\text{Redução logarítmica do RLU do biofilme / cm}^2 = 1,405 + 0,393 * C + 0,188 * T * C * V \quad (\text{D.2})$$

Placa inferior:

$$\text{Redução logarítmica das células do biofilme / cm}^2 = 0,894 + 0,165 * T + 0,263 * C \quad (\text{D.3})$$

$$\text{Redução logarítmica do RLU do biofilme / cm}^2 = 0,825 + 0,135 * T + 0,220 * C \quad (\text{D.4})$$

Os modelos empíricos validados mediante a análise de variância (ANOVA), apresentado na tabela D.1, verifica-se que o coeficiente de determinação (R^2) sugere que aproximadamente 98% dos valores são descritos por os modelos.

Tabela D.1 Análise de variância para os modelos empíricos da remoção do biofilme depois do processo CIP de 3 minutos

	Modelo	R^2	Adj R^2	MS Residual	Total SS	Erro
Superior	D.1	0,97639	0,89375	0,01174	0,9950	0,0235
	D.2	0,98611	0,93751	0,01335	1,9226	0,0267
Inferior	D.3	0,98836	0,94760	0,00652	1,1198	0,0130
	D.4	0,98557	0,93505	0,00423	0,5855	0,0085

ANEXO A – Especificações do detergente alcalino Kalyclean C 272

Descrição:

Sua fórmula contém agentes condicionadores de dureza da água, reduzindo e prevenindo incrustações indesejáveis nos equipamentos. É líquido facilitando seu manuseio, não forma espuma, seus componentes são biodegradáveis. Seu enxágue é extremamente fácil.

Especificações:

Após término da produção, circular água no sistema para remoção dos resíduos sólidos: tubulações, tanques, usar 0,8 a 1,2% (p/v), temperatura de até 80 °C, equipamentos: pasteurizadores, evaporadores, concentradores e sistema UHT usar concentração de 1,2% a 3% (p/v). Sistema UHT usar concentração de 1,2% a 3% (p/v), com temperatura 5 °C acima do processo produtivo. Nas indústrias de alimentos em geral usar de 1% a 3% (p/v). Seu uso é seguro em aço inox, ferro, plásticos.

Requisitos:

- Aparência: líquido levemente opalescente
- Cor: incolor à levemente amarelado
- Densidade: 1,470 - 1,520
- Alcalinidade livre (% NaOH): mínimo 44,5%
- Composição: Hidróxido de sódio
- Sequestrantes
- Coadjuvante
- Atenuador de espuma
- Veículo

Fonte: Direta Higiene Profissional, disponível em:

http://www.diretarp.com.br/ecommerce_site/produto_7730_7845_Desin_crustante-Caustico-Liquido-CIP-BJ-030-KG-KALYCLEAN-C-272#requisitos

ANEXO B – Especificações do detergente ácido Kalyclean A 691

Descrição:

Pode ser usado em qualquer tipo de água, controla a formação de incrustação nos processos onde se usa alta temperatura. KALYCLEAN A 691 é seguro, em uso no aço inoxidável e superfícies vitrificadas. Pode ser usado em alumínio, cobre, zinco e suas ligas assim como equipamentos estanhados. Suas propriedades químicas ajudam na rápida enxaguabilidade.

Especificações:

Tubulação, tanques pasteurizador de placa. Após a fase alcalina circular na concentração de 0,8 a 1,2% com o detergente ácido na temperatura máxima de 65 °C. Concentradores, Evaporadores e Sistemas UTH. Após a fase alcalina, circular a solução na concentração de 1% a 2% na temperatura que estiver programado o equipamento. A concentração depende do tempo de processamento, tipo de sujeira e a dureza da água. Pode ser usado manualmente.

Requisitos:

- Aparência: líquido límpido
- Cor: incolor a levemente esverdeado
- Densidade: 1,305 - 1,325
- Acidez livre em % HNO₃: 49,0 - 52,0%
- Composição: Ácido nítrico
- Coadjuvante
- Tensoativo não iônico
- Veículo

Fonte: Direta Higiene Profissional, disponível em:

http://www.diretarp.com.br/ecommerce_site/produto_7730_7845_Desin_crustante-Caustico-Liquido-CIP-BJ-030-KG-KALYCLEAN-C-272#requisitos

ANEXO C – Procedimento para titulação (m/m) das soluções de limpeza (TAMIME, 2008)*Solução alcalina:*

- I. Pegar 10 ml da solução alcalina com uma pipeta e colocar em um recipiente béquer de 50 mL
- II. Adicionar 3 gotas de fenolftaleína
- III. Adicionar com uma pipeta solução 0,1 mol/L de HCl até a mudança da cor de rosa para transparente
- IV. Contar os ml gastos da solução de HCl

A concentração da solução alcalina é:

$$\% = 0.4 \times V_{\text{gasto}} \quad (\text{C.1})$$

Solução ácida:

- I. Pegar 10 mL da solução ácida com uma pipeta e colocar em um recipiente béquer de 50 mL.
- II. Adicionar 3 gotas de fenolftaleína
- III. Adicionar com uma pipeta solução 0,1 mol/L de NaOH até a mudança permanente da cor de transparente para rosa.
- IV. Contar os mL gastos da solução de NaOH

A concentração da solução ácida é:

$$\% = 0.063 \times V_{\text{gasto}} \quad (\text{C.2})$$