

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DE PROCESSOS DE LIMPEZA DE TANQUES  
DE ARMAZENAMENTO DE LEITE EM UNIDADE DE  
ORDENHA MECANIZADA**

**João Alexandre Sanchez Palencia Rovedilho**  
Engenheiro Químico

ARAÇATUBA - SP  
2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DE PROCESSOS DE LIMPEZA DE TANQUES  
DE ARMAZENAMENTO DE LEITE EM UNIDADE DE  
ORDENHA MECANIZADA**

**João Alexandre Sanchez Palencia Rovedilho**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Helena Giglio Ponsano

ARAÇATUBA – SP  
2023

R873a

Rovedilho, João Alexandre Sanchez Palencia

Avaliação de processos de limpeza de tanques de armazenamento de leite em unidade de ordenha mecanizada / João Alexandre Sanchez Palencia Rovedilho. -- Araçatuba, 2023

49 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Elisa Helena Giglio Ponsano

1. Leite. 2. Limpeza. 3. Microbiologia. 4. Sanitização. 5. Segurança de Alimentos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: AVALIAÇÃO DE PROCESSOS DE LIMPEZA DE TANQUES DE ARMAZENAMENTO DE LEITE EM UNIDADE DE ORDENHA MECANIZADA

AUTOR: JOÃO ALEXANDRE SANCHEZ-PALENCIA ROVEDILHO

ORIENTADORA: ELISA HELENA GIGLIO PONSANO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELISA HELENA GIGLIO PONSANO (Participação Presencial)  
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI (Participação Presencial)  
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. ANA LUCIA BARRETTO PENNA (Participação Presencial)  
Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio Preto/UNESP

Araçatuba, 23 de janeiro de 2023.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JOÃO ALEXANDRE SANCHEZ PALENCIA ROVEDILHO** – Nascido em 29 de setembro de 1991, na cidade de Birigui/SP. Em 2014, concluiu o curso de Graduação em Engenharia Química na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Em 2018, concluiu o curso de Especialização em Engenharia de Segurança do Trabalho pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG). Trabalhou em áreas industriais de alimentos com a produção de lácteos, lácteos pulverizados, atomatados, derivados de milho, maltodextrina e chocolates. Atualmente é fiscal sanitário na vigilância sanitária da Prefeitura Municipal de Araçatuba (SP).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus familiares e envolvidos diretamente nesse processo.

À Profa. Elisa Helena, por todo o companheirismo e paciência, me apoiando em cada desenvolvimento.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina Veterinária e ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

A todos os professores e colaboradores da UNESP que, de alguma forma, fizeram parte desta conquista direta ou indiretamente.

ROVEDILHO, J. A. S. P. **Avaliação de processos de limpeza de tanques de armazenamento de leite em unidade de ordenha mecanizada**. 48 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (SP), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2023.

## RESUMO

O alto valor nutricional do leite o torna, um meio suscetível ao desenvolvimento bacteriano, que é influenciado pelas contaminações que ocorrem durante e após a ordenha. Com o intuito de eliminar contaminações provenientes de equipamentos, as propriedades leiteiras e as indústrias de laticínios adotam a metodologia *clean in place* (CIP) cuja eficiência pode ser avaliada por meio de indicadores microbiológicos. O objetivo deste trabalho de pesquisa foi avaliar a eficiência de higienização em superfícies internas de equipamentos de uma unidade de ordenha mecanizada. Para isso, utilizaram-se três metodologias de limpeza em circuito fechado, alterando-se o binômio tempo de contato e temperatura da solução de detergente (20 min/70 °C, 20 min/75 °C e 25 min/70 °C). Para as análises microbiológicas foi utilizado o método do *swab* de superfície seguido das determinações dos grupos microbianos enterobactérias, mesófilos aeróbios e bolores e leveduras, seguindo-se os métodos oficiais tradicionais, antes e após a aplicação dos processos de higienização. Os resultados foram convertidos para escala logarítmica e avaliados estatisticamente por análise de variância e teste de Tukey, adotando-se 5% como nível de significância. Concluiu-se que todos os procedimentos CIP propostos foram efetivos na redução da carga microbiana das superfícies dos equipamentos de ordenha que fazem contato com o leite, e que os procedimentos a 20 min/75 °C e 25 min/70 °C foram os mais efetivos para o processo de higienização.

Palavras-chave: Leite. Limpeza. Microbiologia. Sanitização. Segurança de Alimentos.

ROVEDILHO, J. A. S. P. **Evaluation of cleaning procedures of milk tanks in a mechanized milking unit.** 48 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (SP), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2023.

## **ABSTRACT**

The high nutritional value of milk makes it susceptible to bacteriological development, which is influenced by the contaminations that occur during and after the milking process. In order to eliminate the contamination coming from equipment, the dairy farms and industries adopt the clean in place (CIP) methodology, whose efficiency can be evaluated by microbiological indicators. The objective of this research was to evaluate the efficiency of cleaning on internal surfaces of the equipment of a mechanized milking unit. For that, three closed-circuit cleaning methodologies were used, changing the contact time and the temperature of the detergent solution (20 min/70 °C, 20 min/75 °C and 25 min/70 °C). The surface swab method was used for the microbiological analysis, followed by the determination of the microbial groups enterobacteria, aerobic mesophylls and molds and yeast, which were performed by analytical official traditional methods, before and after the application of the cleaning processes. The results were converted to logarithmic scale and statistically evaluated by analysis of variance and Tukey's test, adopting 5% as the significance level. It was concluded that all the proposed CIP procedures were effective in reducing the microbial load on the surfaces of milking equipment that contact milk, and that the procedures at 20 min/75 °C and 25 min/70 °C were the most effective for the cleaning operation.

Keywords: Cleaning. Food Safety. Microbiology. Milk. Sanitization.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagens de enterobactérias, bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias facultativas viáveis e bolores e leveduras (médias $\pm$ desvios padrões) após a aplicação dos procedimentos de higienização e o respectivo percentual de redução no comparativo antes e após o CIP. ....	43
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Layout simplificado da linha de ordenha mecanizada (números) e pontos de coleta do teste de esfregaço (letras)..... 40
- Figura 2 - Médias obtidas antes e depois do procedimento de limpeza CIP para contagens de enterobactérias, bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias facultativas viáveis e bolores e leveduras (escala logarítmica). ..... 41
- Figura 3 - Boxplot para cada metodologia e cada grupo microbiano dos resultados obtidos após o processo de higienização (escala logarítmica). ..... 42

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1.1 Revisão da literatura .....	12
1.1.1 Produção de leite no Brasil.....	12
1.1.2 Legislação brasileira referente à produção e à qualidade do leite .....	12
1.1.3 Higienização de equipamentos de contato com o leite.....	14
1.1.4 Biofilmes e limpeza <i>clean in place</i> (CIP) .....	15
1.1.5 Contaminantes dos produtos lácteos .....	17
1.1.6 Indicadores microbianos .....	18
1.2 Objetivo.....	19
2 CAPÍTULO 1 - VARIAÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA NA HIGIENIZAÇÃO CIP DE EQUIPAMENTOS DE ORDENHA MECANIZADA AFETAM OS INDICADORES MICROBIANOS .....	21
2.1 Abstract.....	21
2.2 Resumo .....	22
2.3 Introdução.....	23
2.4 Materiais e métodos.....	24
2.4.1 Descrição da unidade de ordenha mecanizada.....	24
2.4.2 Procedimento de higienização.....	25
2.4.3 Pontos amostrais.....	26
2.4.4 Metodologia de coleta de amostras.....	26
2.4.5 Análises microbiológicas.....	26
2.4.6 Análises estatísticas.....	26
2.5 Resultados e discussão .....	27
2.6 Conclusão.....	28
2.7 Declaração de conflito de interesse.....	28
2.8 Contribuição dos autores .....	29
2.9Referências.....	29
APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL .....	33
APÊNDICE B – INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES.....	40
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIÊNCIA RURAL .....	44

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Independente da origem, os alimentos podem conter agentes causadores de danos ao consumidor de forma física, química ou biológica, e a quantidade desses agentes está diretamente relacionada às práticas utilizadas desde o cultivo ou criação, passando pelos métodos de processamento e industrialização, até as condições de armazenamento e transporte (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O leite é um alimento de alto valor nutricional e, devido a suas características de pH próximo à neutralidade e alta atividade de água, é suscetível à contaminação durante as etapas de obtenção, estocagem, transporte e processamento, o que o torna um veículo potencial de agentes causadores de doenças de origem alimentar (DESMARCHELIER, 2001).

Dentre as possíveis contaminações, o leite pode conter substâncias estranhas de ordem física (pedaços de insetos, de plástico, pregos e agulhas), química (herbicidas, resíduos de antibióticos e sanitizantes) ou microbiológica (bactérias, fungos e vírus), provenientes de efeitos externos como cuidados inadequados no processo de ordenha e na refrigeração pós-ordenha (CNI; SENAI; SEBRAE; EMBRAPA, 2005).

Quando em contato com utensílios de ordenha, superfícies de equipamento ou tanques de refrigeração com deficiência de higienização, o leite pode se contaminar, levando a um aumento significativo na contagem bacteriana (GUERREIRO *et al.*, 2005).

Este trabalho de pesquisa se justifica pela necessidade de se investigar a eficiência da realização de operações de limpeza em uma linha de ordenha mecanizada com o intuito de evitar contaminações do leite cru fornecido a laticínios e atender aos requisitos legais de condições higiênico-sanitárias de produção e fabricação.

## **1.1 Revisão da literatura**

### **1.1.1 Produção de leite no Brasil**

A produção leiteira tem aumentado nos últimos 50 anos no Brasil. De 1961 a 2015, houve um crescimento linear na produção leiteira brasileira, com acréscimo de 30 milhões de toneladas e ganho médio anual de 555 mil toneladas (VILELA *et al.*, 2017). Em 2019 foram produzidos 34,84 bilhões de litros de leite no Brasil e, sendo responsável por 27,11% do total da produção nacional, o estado de Minas Gerais figurava na primeira posição entre os estados brasileiros, seguido por Paraná (12,45%), Rio Grande do Sul (12,26%), Goiás (9,13%), Santa Catarina (8,71%) e São Paulo (4,74%) (HOTT; ANDRADE; MAGALHÃES, 2021).

No terceiro trimestre de 2021, foram produzidos no Brasil 6.157.114 mil litros de leite cru (resfriado ou não), passando para 6.404.735 mil litros no quarto trimestre daquele ano. Em contrapartida, no primeiro trimestre de 2022, foi observada uma redução na produção, alcançando um patamar de 5.875.533 mil litros de leite cru (IBGE, 2022). Baseando-se em um modelo matemático, se prevê uma produção de 44,2 bilhões de litros de leite no Brasil no ano de 2025 (MELO, 2021).

A produção de leite no Brasil possui diversos níveis tecnológicos ou organizacionais, ou seja, é realizada por pequenos produtores de origem familiar, evoluindo em pequenas cooperativas e consagrando-se em propriedades de grande porte e patamar tecnológico elevado (FARINA *et al.*, 2005). No levantamento realizado pelo site Milkpoint (2022), os cem maiores produtores brasileiros de leite foram responsáveis pela produção diária de 25.508 litros de leite em 2021 e, devido a eles, a região sudeste se destacou como a maior produtora, produzindo 488 milhões de litros de leite naquele ano.

Contribuem para os avanços tecnológicos na produção (área rural) e na industrialização, os sensores para monitoramento de parâmetros, físicos, químicos e biológicos, além do conhecimento de especialistas para uma produção pecuária mais técnica e de melhor qualidade de produtos e processos (VILELA *et al.*, 2017).

### **1.1.2 Legislação brasileira referente à produção e à qualidade do leite**

Com a implementação da Instrução Normativa Nº 51 de 18 de setembro de 2002 (IN 51/2002) do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA),

definiram-se os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite cru e dos diferentes tipos de leites pasteurizados que, àquela época eram A, B e C (BRASIL, 2002). A partir da publicação da Instrução Normativa Nº 62 de 29 de dezembro de 2011, os leites pasteurizados tipo B e C foram substituídos pelo leite pasteurizado e novos padrões de produção, identidade e qualidade foram definidos para esse tipo de leite, bem como para o leite cru refrigerado que lhe daria origem (BRASIL, 2011).

No ano de 2018, a Instrução Normativa Nº 62 foi substituída pela Instrução Normativa Nº 76 de 26 de novembro de 2018 (IN 76/2018), a qual definiu novas características de identidade e qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. A IN 76/2018 define que o leite cru proveniente de tanque individual ou de uso comunitário deve apresentar médias geométricas trimestrais de Contagem Padrão em Placas de, no máximo, 300.000 UFC/mL (BRASIL, 2018a). Também define que o leite cru deve apresentar a seguinte composição centesimal: 3 g/100 g (três gramas por cem gramas de produto) de gordura, 2,9 g/100 g de proteína total, 4,3 g/100 g de lactose anidra, 8,4 g/100 g de sólidos não gordurosos e 11,4 g/100 g de sólidos totais (BRASIL, 2018a).

A Instrução Normativa Nº 77 de 26 de novembro de 2018 (IN 77/2018), lançada simultaneamente à IN 76/2018, estabelece critérios e procedimentos para produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial (BRASIL, 2018b). Dentre as boas práticas agropecuárias que visam à obtenção de matéria-prima em condições higiênico-sanitárias adequadas, a IN 77/2018 prevê a higienização de superfícies, equipamentos e instalações, incluindo os tanques de refrigeração e armazenamento do leite, de uso individual ou comunitário, e os equipamentos de ordenha, que devem ser higienizados de acordo com as recomendações do fabricante (BRASIL, 2018b). Ainda, de acordo com a IN 77/2018, os procedimentos de higienização adotados nas propriedades rurais devem estar descritos no programa de autocontrole da matéria-prima, que deve ser elaborado pela indústria, como parte de seu plano de qualificação de fornecedores de leite.

### 1.1.3 Higienização de equipamentos de contato com o leite

Para a adoção de medidas suficientemente adequadas para a higienização de equipamentos e superfícies industriais, deve-se levar em consideração a composição dos alimentos e as características dos processos. No caso do leite, os resíduos do processo produtivo são as proteínas, os carboidratos, os sais minerais e a gordura. As proteínas e os sais minerais são de difícil limpeza, estes devido à insolubilização e, aquelas, devido à desnaturação e consequente formação de incrustações. Já os carboidratos são solúveis em água e de fácil remoção (SANTOS, 2010).

Quando os maquinários de ordenha mecanizada estão parados em intervalos de produção, pode haver a deposição de sujidades, com formação de incrustações e biofilmes nos equipamentos (HAYES; BOOR, 2001). Após aderirem à superfície dos equipamentos, os microrganismos podem resistir ao processo de limpeza, impactando a qualidade do leite (SANTOS; FONSECA, 2001), daí a necessidade de realização de higienização adequada para garantir que não haja a contaminação do leite por bactérias presentes nas superfícies de contato dos equipamentos (HAYES; BOOR, 2001).

Guerreiro *et al.* (2005) avaliaram a qualidade do leite de diferentes propriedades e verificaram que o leite que apresentava melhor qualidade, definida pela contagem inicial de bactérias, era proveniente da propriedade que possuía maior rigor e critério no atendimento às práticas preventivas de higiene. Essas atividades incluíam a higienização de utensílios e equipamentos com água quente ou morna e a utilização de solução clorada.

Cavalcanti *et al.* (2010) encontraram redução de mais de um ciclo logarítmico no número de microrganismos mesófilos e psicrófilos ao realizar a limpeza da superfície de contato dos equipamentos com o leite, demonstrando a efetividade da realização da higienização antes do início do processo produtivo para garantir a diminuição da carga microbológica no meio de contato com o produto. Em um estudo realizado para avaliar os efeitos do leite residual nas superfícies de contato não higienizadas do interior de caminhões de transporte, Kuhn, Meunier-Goddik e Waite-Cusic (2018) encontraram que as contagens de bactérias mesófilas, bactérias lácticas e coliformes totais, entre outros, se intensificavam com o tempo.

Com o intuito de garantir a limpeza dos equipamentos de contato com alimentos com a maior remoção possível dos resíduos, deve-se utilizar uma metodologia que contemple as etapas de pré-limpeza, limpeza, enxágue, desinfecção e novo enxágue (ANDRADE, 2008). Ainda segundo o autor, um exemplo comum de limpeza em áreas industriais inclui pré-limpeza com água potável em temperatura ambiente, limpeza com detergente alcalino a 80 °C por 20 minutos de circulação, enxágue com água e desinfecção com solução ácida a 45 °C e, caso necessário, novo enxágue das tubulações e equipamentos.

#### **1.1.4 Biofilmes e limpeza *clean in place* (CIP)**

Os biofilmes bacterianos se constituem em uma matriz formada por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, que se desenvolvem como uma camada protetora sobre as superfícies internas de equipamentos de contato com alimentos, sendo um problema recorrente na indústria de alimentos (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Essas estruturas são formadas por um conjunto de células bacterianas, com ligações entre si e com adesão ao substrato ou superfície de contato (DONLAN; COSTERTON, 2002), com a finalidade de se defender das intempéries do ambiente externo, tais como alterações de pH e temperatura e ação de agentes químicos e físicos) (CLUTTERBUCK *et al.*, 2007).

As etapas de formação de biofilmes bacterianos consistem em adesão das bactérias na superfície de contato; consolidação das bactérias nas superfícies, formando polímeros; colonização e reprodução das bactérias (NORTERMANS; DORMANS; MEAD, 1991). Os biofilmes são encontrados na indústria de laticínios, principalmente em equipamentos para estocagem de leite (TEH *et al.*, 2015).

O mecanismo de formação dos biofilmes torna os microrganismos mais resistentes ao processo de limpeza e desinfecção (GAN *et al.*, 2021), motivo de preocupação do ponto de vista de segurança do alimento, devido às bactérias patogênicas que podem estar ali aderidas, representando um perigo em potencial para os consumidores (SIQUEIRA *et al.*, 2021). Por esse motivo, a limpeza *clean in place* (CIP) é recomendada para a higienização de equipamentos em linhas de produção de leite (LIU *et al.*, 2020; OSTROV *et al.*, 2016).

A limpeza CIP baseia-se em métodos físicos de higienização, aliados à utilização de agentes químicos como detergentes e agentes biológicos como

enzimas, com o intuito de obtenção de um ambiente livre de biofilmes. Trata-se de um procedimento automatizado onde a limpeza regular das tubulações e equipamentos é realizada com o auxílio de soluções ácidas e alcalinas aplicadas sob altas temperaturas (SILVA *et al.*, 2020).

Na limpeza CIP são levados em consideração a temperatura das soluções, o tempo de circulação das soluções nos equipamentos, a concentração dos produtos químicos e a turbulência do fluido (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005). Temperaturas mais elevadas favorecem o processo de limpeza devido à redução da tensão superficial e da viscosidade do fluido (TAMIME, 2008). Além disso, permitem a solubilização das sujidades de forma mais eficiente com ação mais efetiva dos detergentes (JACQUES; LYONS; KELSALL, 2003).

O fator tempo no CIP se relaciona à duração das etapas de limpeza e à frequência de realização. Por isso, o tempo utilizado em uma operação CIP deve ser suficiente para provocar a dissolução e a remoção das sujidades presentes nos equipamentos, considerando-se todas as etapas necessárias para o procedimento (LELIEVELD; MOSTERT; HOLAH, 2005). A concentração dos produtos químicos utilizados no CIP deve ser suficiente para realizar a decomposição das sujidades em frações inferiores, solubilizar os depósitos presentes nas superfícies dos equipamentos e tubulações e garantir a movimentação das sujidades removidas em suspensão na solução (TAMIME, 2008).

Por fim, para a eficiente higienização de tubulações, o procedimento CIP exige que haja energia cinética nas soluções de limpeza, ou seja, o fluxo das soluções deve ocorrer em estágio turbulento para favorecer a remoção dos depósitos das sujidades. No caso de tanques de estocagem, são utilizados *spray balls* ou outros dispositivos para garantir que haja ação mecânica no interior das superfícies (TAMIME, 2008).

O uso destas soluções de detergentes garante a obtenção de superfícies limpas e a eliminação de resíduos orgânicos nos pontos de difícil higienização. No entanto, mesmo com a utilização do tratamento CIP, podem restar microrganismos nas superfícies internas dos equipamentos higienizados (SHI; ZHU, 2009).

### 1.1.5 Contaminantes dos produtos lácteos

O Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017 (BRASIL, 2017) define o leite como o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. O leite obtido nestas condições deve atender aos padrões pré-definidos no referido decreto para evitar prejuízos aos consumidores.

Os microrganismos presentes em alimentos, por si só, não são indicadores de baixa qualidade do produto ou de riscos para o consumidor. Verifica-se que, usualmente, os alimentos se tornam perigosos somente quando ocorrem desvios relacionados à sanitização e à higiene dos processos e na cadeia de suprimentos e armazenamento (ICMSF, 2015).

O leite pode ser considerado um meio de cultura ideal para o desenvolvimento de bactérias e outros microrganismos, que podem acarretar danos à saúde pública, se forem patogênicos, defeitos na qualidade industrial e redução na vida de prateleira, se forem deteriorantes. Dentre as alterações que podem ocorrer na qualidade do produto, podem ser citadas a acidificação, a coagulação, a produção de gases, alterações de características sensoriais e organolépticas, acarretando redução na vida de prateleira dos produtos (CASSOLI, 2005).

Durante o armazenamento e o transporte, o leite é suscetível ao desenvolvimento de bactérias do grupo *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, entre outras) causadores de gastroenterites, bactérias mesófilas aeróbias, e de fungos (bolores e leveduras) desenvolvedores de micotoxinas. Em uma pesquisa realizada por Ryu *et al.* (2021) foram verificados ambientes e equipamentos de fazendas produtoras de leite, tendo sido detectada a presença de bolores e leveduras em pontos internos dos equipamentos de ordenha e dos filtros de leite, além de outros pontos externos das propriedades (HAYES; BOOR, 2001).

A principal causa do aumento nos níveis de *Enterobacteriaceae* em laticínios é a contaminação proveniente de áreas produtivas (ICMSF, 2015). Por isso, a testagem ambiental se torna peça-chave na avaliação de medidas preventivas, já que esse grupo microbiano é indicador de boas práticas de higiene (ICMSF, 2015).

Apesar da suscetibilidade do leite ao desenvolvimento microbiano, em um estudo foi detectado a presença de *Campylobacter* apenas em duas amostras de

leite cru (de um total de 15 amostras analisadas) em um estabelecimento que aplica ações de boas práticas de fabricação (BPF) e boas práticas agropecuárias (BPA), na região de Curitiba (Paraná), demonstrando que essas ações são capazes de assegurar a qualidade do leite (NARCISO; MONTANHINI, 2014).

O leite se deteriora de forma rápida, mesmo sob refrigeração, com a proliferação de grande número de bactérias. Em alguns casos, verifica-se o dobro da população de microrganismos a cada 20 a 30 minutos. Por isso, é recomendável que o leite seja manuseado corretamente desde o momento da ordenha até chegar à indústria de laticínios (GUERREIRO *et al.*, 2005).

### **1.1.6 Indicadores microbianos**

A IN 77/2018 define que compete às indústrias, como parte do programa de autocontrole, a implementação de um plano de qualificação de fornecedores de leite, no qual se apresentem, no mínimo, objetivos, metas, indicadores e cronograma para implementação e/ou execução de BPA (BRASIL, 2018b). Para a estruturação de um programa de gestão de segurança e qualidade de alimentos, podem-se utilizar análises microbiológicas como indicadoras de performance de boas práticas de higienização. Essas análises servem como ferramenta de apoio para a avaliação de processos de desinfecção ou falhas na fabricação (ICMSF, 2015).

Para a verificação de eventuais contaminações no processo produtivo, usualmente são pesquisados os microrganismos indicadores, que são espécies fornecedoras de indicativos de ocorrência de contaminação ou de condições sanitárias inadequadas durante o processamento, a produção ou o armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Os indicadores microbianos são utilizados para avaliar a eficácia e os benefícios da implementação de um programa de boas práticas de fabricação (BPF) relacionado à segurança dos alimentos e à qualidade do leite, uma vez que esses dados podem ser utilizados para avaliar a eficiência dos processos de desinfecção e limpeza de estruturas (DIAS *et al.*, 2012).

A utilização do grupo coliformes como indicador de qualidade higiênico-sanitária é prática consolidada na produção e na industrialização do leite pois permite a verificação das condições empegadas durante a ordenha, bem como eventuais falhas na pasteurização (OLIVEIRA, 2016). Além disso, o grupo coliforme permite avaliar a condição higiênico-sanitária dos produtos lácteos e do ambiente de

processamento e armazenamento (OLIVEIRA, 2016). A identificação de grupos bacterianos, incluindo os coliformes e as enterobactérias, representam indícios de deficiência de sanitização ou contaminação após a pasteurização em produtos lácteos (HEBERT *et al.*, 2016).

Para Barbosa *et al.* (2011), condições aceitáveis de higienização de superfícies são atestadas com contagem de coliformes totais de, no máximo, 50 UFC/cm<sup>2</sup>. De acordo com os autores, esse limite segue o estabelecido pela Organización Panamericana de la Salud (OPAS) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Contudo, não há limite legal na legislação brasileira para o grau de contaminação das superfícies de contato com o leite (RODRIGUES; FERREIRA, 2016).

Além do grupo coliformes, o número elevado na contagem de bactérias mesófilas aeróbias pode indicar contaminação no leite cru, relacionada a falhas na higienização dos tetos antes da ordenha ou no sistema de sanitização dos equipamentos que entram em contato com o leite (BRITO; ARCURI; BRITO, 2000). Após a efetivação da limpeza de superfícies de contato direto com alimentos, consideram-se efetivamente higienizadas aquelas que obtêm resultados limitados a 2 UFC/cm<sup>2</sup> (APHA, 2001).

A presença de microrganismos como coliformes totais e bolores e leveduras pode indicar falhas higiênico-sanitárias no processamento do leite, levando a alterações que acarretam impacto na qualidade do leite, quanto aos aspectos físico-químicos, organolépticos e de durabilidade do produto (MACHADO *et al.*, 2012).

Considerando a necessidade de garantir condições produtivas satisfatórias das propriedades leiteiras, faz-se necessária a realização de procedimentos de limpeza específicos e eficazes nos equipamentos da linha de produção, principalmente em superfícies de contato direto com leite, para alcançar os requisitos microbiológicos mínimos e a segurança microbiológica do produto, o que justifica a realização deste trabalho de pesquisa.

## **1.2 Objetivo**

O objetivo neste trabalho de pesquisa foi investigar a eficiência de distintos procedimentos de limpeza CIP em uma propriedade leiteira de ordenha mecanizada

utilizando indicadores microbianos (bactérias mesófilas aeróbias, enterobactérias e bolores e leveduras).

## **2 CAPÍTULO 1 - VARIAÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA NA HIGIENIZAÇÃO CIP DE EQUIPAMENTOS DE ORDENHA MECANIZADA AFETAM OS INDICADORES MICROBIANOS**

Time and temperature variations in CIP cleaning of mechanized milking equipment affect microbial indicators

João Alexandre Sanchez Palencia Rovedilho Elisa Helena Giglio Ponsano

### **2.1 Abstract**

The high nutritional value of milk makes it susceptible to bacteriological development, which is influenced by the contaminations that occur during and after the milking process. In order to eliminate the contamination coming from equipment, the dairy farms and industries adopt the clean in place (CIP) methodology, whose efficiency can be evaluated by microbiological indicators. The objective of this research was to evaluate the efficiency of cleaning on internal surfaces of the equipment of a mechanized milking unit. For that, three closed-circuit cleaning methodologies were used, changing the contact time and the temperature of the detergent solution (20 min/70 °C, 20 min/75 °C and 25 min/70 °C). The surface swab method was used for the microbiological analysis, followed by the determination of the microbial groups enterobacteria, aerobic mesophylls and molds and yeast, which were performed by analytical official traditional methods, before and after the application of the cleaning processes. The results were converted to logarithmic scale and statistically evaluated by analysis of variance and Tukey's test, adopting 5% as the significance level. It was concluded that all the proposed CIP procedures were effective in reducing the microbial load on the surfaces of milking equipment that contact milk, and that the procedures at 20 min/75 °C and 25 min/70 °C were the most effective for the cleaning operation.

Keywords: Cleaning. Food Safety. Microbiology. Milk. Sanitization.

## 2.2 Resumo

O alto valor nutricional do leite o torna um meio suscetível ao desenvolvimento bacteriano, que é influenciado pelas contaminações que ocorrem durante e após a ordenha. Com o intuito de eliminar contaminações provenientes de equipamentos, as propriedades leiteiras e as indústrias de laticínios adotam a metodologia *clean in place* (CIP) cuja eficiência pode ser avaliada por meio de indicadores microbiológicos. O objetivo deste trabalho de pesquisa foi avaliar a eficiência de higienização em superfícies internas de equipamentos de uma unidade de ordenha mecanizada. Para isso, utilizaram-se três metodologias de limpeza em circuito fechado, alterando-se o binômio tempo de contato e temperatura da solução de detergente (20 min/70 °C, 20 min/75 °C e 25 min/70 °C). Para as análises microbiológicas foi utilizado o método do *swab* de superfície seguido das determinações dos grupos microbianos enterobactérias, mesófilos aeróbios e bolores e leveduras, seguindo-se os métodos oficiais tradicionais, antes e após a aplicação dos processos de higienização. Os resultados foram convertidos para escala logarítmica e avaliados estatisticamente por análise de variância e teste de Tukey, adotando-se 5% como nível de significância. Concluiu-se que todos os procedimentos CIP propostos foram efetivos na redução da carga microbiana das superfícies dos equipamentos de ordenha que fazem contato com o leite, e que os procedimentos a 20 min/75 °C e 25 min/70 °C foram os mais efetivos para o processo de higienização.

Palavras-chave: Leite. Limpeza. Microbiologia. Sanitização. Segurança de Alimentos.

## 2.3 Introdução<sup>1</sup>

O leite pasteurizado é um alimento altamente consumido no Brasil. Isso se deve, principalmente, ao valor nutricional elevado, uma vez que ele contém vitaminas, gorduras, proteínas, carboidratos e sais minerais. Essas características nutricionais do leite, além de seu pH próximo da neutralidade e sua alta atividade de água o tornam um meio suscetível ao desenvolvimento microbiano com espécies deteriorantes e/ou patogênicas (SALVADOR *et al.*, 2012; BRITO *et al.*, 2007). As contaminações ocorridas durante e após a ordenha influenciam a carga microbiana do produto, daí a necessidade de garantir condições higiênico-sanitárias satisfatórias durante todo o processo produtivo do leite para obter um produto que atenda aos padrões de qualidade e limites legais (AGUILAR *et al.*, 2018).

A contaminação do leite pode se iniciar na ordenha pelos microrganismos presentes nos tetos e no corpo da vaca e, em seguida, pelos microrganismos presentes nos equipamentos e utensílios sem adequada higienização (SANTOS; FONSECA, 2001). Apesar de a pasteurização promover a redução do número de bactérias, a quantidade de microrganismos no leite cru influencia diretamente os números observados nos produtos, evidenciando a necessidade de cuidados higiênicos com o intuito de evitar contaminações no momento da ordenha para reduzir a ação microbiana (SALVADOR *et al.*, 2012).

A limpeza de equipamentos utilizados em contato com o leite é foco de pesquisas devido ao impacto que representa sobre a qualidade do leite cru e de seus derivados (IRIE *et al.*, 2021). Na indústria de laticínios é adotada a metodologia *clean in place* (CIP) para garantir a eficiência das higienizações, o que também se verifica em propriedades leiteiras de médio e grande porte, especialmente na área de ordenha, por se tratar de um processo mais efetivo para a remoção de bactérias que impregnam as superfícies internas de equipamentos de contato direto com o leite (PERKINS *et al.*, 2009).

Em condições ambientais favoráveis e na presença de substrato, as bactérias se organizam formando biofilmes e tornando-se mais resistentes aos processos de limpeza e desinfecção (GAN *et al.*, 2021), motivo de preocupação do ponto de vista de segurança do alimento, devido às bactérias patogênicas que podem estar ali

---

<sup>1</sup> Normas de Publicação da Revista Ciência Rural (Anexo A).

aderidas (SIQUEIRA *et al.*, 2021). Por esse motivo, a limpeza CIP é recomendada para a higienização de equipamentos em linhas de produção de leite (OSTROV *et al.*, 2016).

A limpeza CIP baseia-se em métodos físicos de higienização, aliados à utilização de agentes químicos como detergentes e agentes biológicos como enzimas, com o intuito de obtenção de um ambiente livre de biofilmes. Trata-se de um procedimento automatizado onde a limpeza regular das tubulações e equipamentos é realizada com o auxílio de soluções ácidas e alcalinas aplicadas sob altas temperaturas sem a necessidade de desmontagem dos equipamentos utilizados (SILVA *et al.*, 2020).

Estes processos de limpeza devem ser validados para a elaboração de programa de qualidade, o que pode ser feito por meio de indicadores biológicos (IRIE *et al.*, 2021). Microrganismos indicadores são utilizados na avaliação da condição sanitária das superfícies de contato com o leite, pois refletem a presença de contaminações nos processos de obtenção e fabricação (SOUAD *et al.* 2021). Para a avaliação da limpeza das superfícies, são pesquisadas as bactérias mesófilas aeróbias (BRITO *et al.*, 2000), as enterobactérias e os bolores e leveduras (MACHADO *et al.*, 2012), que podem indicar possíveis falhas no processo de limpeza nas superfícies de equipamentos em contato direto com o leite.

O objetivo deste trabalho de pesquisa foi avaliar a eficiência de distintos procedimentos de limpeza CIP em uma propriedade leiteira de ordenha mecanizada utilizando indicadores microbianos (bactérias mesófilas aeróbias, enterobactérias e bolores e leveduras) a fim de fornecer subsídios aos estabelecimentos beneficiadores de leite para a elaboração de seu plano de qualificação de produtores de leite.

## **2.4 Materiais e métodos**

### **2.4.1 Descrição da unidade de ordenha mecanizada**

As amostras foram coletadas em uma unidade de ordenha mecanizada localizada em uma propriedade rural no município de Turiúba (SP), localizado na região de Araçatuba (SP) interior do estado de São Paulo, Brasil, no período de janeiro a dezembro de 2021, com horário de coleta no período da tarde. A propriedade possui programa de qualidade do leite, realiza boas práticas de manejo

do rebanho, e conta com equipamentos apropriados para a aplicação da metodologia de limpeza CIP. A Fig. 1 demonstra o *layout* esquemático e simplificado da linha de ordenha até a coleta pelo laticínio.

#### **2.4.2 Procedimento de higienização**

O procedimento de limpeza iniciou-se com o fechamento do sistema de ordenha para permitir a realização do CIP. Conforme ilustrado na Fig. 1, os equipamentos de 1 a 4 mantiveram-se em circuito fechado com o tanque intermediário (5) e, em seguida, as soluções foram encaminhadas ao tanque de resfriamento (6) e, finalmente, descartadas.

O processo completo de higienização consistiu em três etapas:

Na etapa 1, a remoção dos resíduos de leite do interior das tubulações e equipamentos foi realizada por meio de enxágue com água potável circulante, por um período de 10 minutos, seguida do descarte da solução na saída dos equipamentos.

Para a etapa 2, foi utilizada uma solução de detergente alcalino clorado (composição: hidróxido de sódio, hipoclorito de sódio, tensoativo não iônico, sequestrante e veículo), conforme definido pelo procedimento de limpeza fornecido pelo laticínio que realiza a aquisição do leite e preparada conforme estabelecido no programa de sanitização, também fornecido pelo laticínio, seguindo a orientação do fabricante do produto. A solução de detergente foi aquecida até a temperatura adequada para cada procedimento com o auxílio de uma resistência e, em seguida, foi bombeada por todo o sistema em circuito fechado, permanecendo por diferentes períodos, de acordo com cada procedimento.

A etapa 3 consistiu em um novo enxágue para a remoção dos resíduos do produto químico. A água potável foi circulada por 10 minutos e descartada na saída dos equipamentos.

Os três procedimentos de higienização testados neste estudo diferiam nas combinações de temperatura da solução de detergente alcalino clorado e tempo de circulação na etapa 2, conforme preconizados pelo fabricante do detergente, da seguinte forma:

- Procedimento 1 (tratamento 1) - 70 °C e 20 minutos;

- Procedimento 2 (tratamento 2) - 75 °C e 20 minutos;
- Procedimento 3 (tratamento 3) - 70 °C e 25 minutos.

### **2.4.3 Pontos amostrais**

Para a determinação dos pontos amostrais, foram levadas em conta as características físicas da linha de ordenha (existência de aberturas), a dificuldade para a realização de limpeza CIP (zonas de difícil acesso) e a possibilidade de coleta das amostras (alcance do *swab*). Desse modo, foram identificados sete pontos para a realização das coletas para as análises microbiológicas, que estão demonstrados na Fig. 1.

### **2.4.4 Metodologia de coleta de amostras**

Foram investigadas 84 amostras, 42 amostras antes e 42 amostras após a aplicação dos procedimentos de limpeza, coletadas no interior dos equipamentos definidos na Fig. 1. Utilizou-se o método de esfregaço, em que um *swab* seco foi friccionado nas direções horizontal, vertical e diagonal por uma área amostral de 100 cm<sup>2</sup> e inserido em 10 mL de água peptonada 0,1% e imediatamente transportado até o laboratório em caixa térmica contendo gelo.

### **2.4.5 Análises microbiológicas**

Para a determinação da efetividade dos procedimentos de higienização foram realizadas as pesquisas de bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias facultativas viáveis (bactérias mesófilas aeróbias), enterobactérias e bolores e leveduras, de acordo com as metodologias descritas em APHA (2001), em duplicatas. A contagem de colônias foi realizada em contador de colônias e expressa em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). O conteúdo da água peptonada utilizada para a coleta e o transporte das amostras foi considerada a 1ª diluição.

### **2.4.6 Análises estatísticas**

Os dados foram convertidos para escala logarítmica e submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey com 5% de probabilidade, utilizando-se a ferramenta R-Studio.

## 2.5 Resultados e discussão

As médias e os intervalos de confiança das médias dos indicadores microbianos antes e após cada procedimento de higienização CIP estão apresentados na Fig. 2.

A realização de avaliações de procedimentos de limpeza é crucial para verificar a implementação de protocolos de higienização (BUCZINSKI, 2022) e os dados obtidos neste estudo fornecem subsídios para avaliações de limpezas CIP quando de sua implementação em fazendas produtoras de leite. A Fig. 2 mostra que todos os procedimentos de limpeza provocaram redução no número de microrganismos nos pontos estudados, confirmando a necessidade da realização de limpeza para reduzir a carga microbiana na superfície interna de equipamentos de contato com o leite cru.

Este estudo demonstrou que, apesar das metodologias de limpeza propiciarem uma redução na carga de bactérias mesófilas aeróbias (Fig. 2), elas não foram suficientes para atingir 2 UFC/cm<sup>2</sup>, conforme recomendado pela American Public Health Association (APHA, 2001) para superfícies de contato direto com alimentos.

As médias, os respectivos desvios padrões, bem como os percentuais de redução da carga microbiana obtidos após a aplicação de procedimentos de higienização estão dispostos na Tabela 1. A Fig. 3 demonstra os *boxplots* para os resultados obtidos em escala logarítmica após o procedimento de limpeza CIP.

O acréscimo do tempo de circulação de 20 para 25 minutos (metodologias 1 e 3) ocasionou diminuição nas contagens de mesófilos aeróbios e bolores e leveduras após o procedimento CIP, indicando a importância do tempo de exposição da superfície interna dos equipamentos com a solução de detergente para a redução desses grupos microbianos. Este dado corrobora com o obtido por DUFOUR *et al.* (2004), que encontraram resultados mais efetivos na redução microbiana quando a duração do tratamento CIP foi mais prolongado. ZOU & LIU (2018) também, encontraram maior redução da população bacteriana ao realizarem a limpeza de superfícies internas com contato direto com leite em uma unidade de processamento de leite em pó com soluções alcalinas a 80 °C por 20 minutos, quando comparadas ao CIP realizado por 10 minutos.

A comparação entre os procedimentos 1 e 2 mostrou que um aumento de 5 °C na temperatura da solução de detergente alcalino clorado, com manutenção do mesmo tempo de contato, provocou maior redução nas contagens microbianas dos grupos mesófilos aeróbios e bolores e leveduras, indicando a importância da temperatura na destruição microbiana. PALIY *et al.* (2021) também encontraram maior eficiência para o procedimento CIP em linhas de obtenção de leite utilizando solução de limpeza com temperatura de 85 °C quando comparadas com a solução a 60 °C.

Embora existam diferenças entre os *layouts* de equipamentos, os dados encontrados neste estudo servem de subsídios ao produtor rural na tomada de decisão para aumentar a eficiência da limpeza CIP, ou seja, ele poderá optar por aumentar a temperatura da solução ou o tempo de operação, conforme lhe for mais conveniente. Os resultados obtidos também permitem embasar a definição de procedimentos de limpeza CIP pelos laticínios para utilização nas fazendas produtoras de leite, de modo a integrar o programa de autocontrole de matérias-primas e o programa de qualificação de fornecedores de leite.

Por fim, pode-se considerar, em um estudo futuro, a avaliação de outros procedimentos de limpeza CIP com diferentes binômios de tempo e temperatura, buscando maior redução microbiana nas superfícies internas dos equipamentos de contato de sistemas de ordenha em fazendas produtoras de leite.

## **2.6 Conclusão**

Os procedimentos de higienização CIP testados foram eficientes na redução da carga microbiana e a comparação entre eles permite concluir que o aumento no tempo de contato da solução de higienização com a superfície de limpeza em 5 minutos (de 20 minutos para 25 minutos) e o aumento da temperatura inicial da solução de detergente em 5 °C (70 °C para 75 °C) foram mais eficazes na redução da carga microbiana nas superfícies de contato dos equipamentos da linha de ordenha analisada.

## **2.7 Declaração de conflito de interesse**

Não temos conflito de interesse a declarar.

## 2.8 Contribuição dos autores

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

## 2.9 Referências

AGUILAR, C. E. G. et al. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e engenharia de alimentos da Universidade de São Paulo, 2018. 220 p.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington, DC: APHA, 2001.

BRITO, M. A. et al. **Composição do leite**. Brasília, DF: Agência de Informação Embrapa; Embrapa Gado de Leite, 2007. Available from: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_128\\_21720039243.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html)>. Accessed: Jun. 15, 2022.

BRITO, M. A. V. P. et al. Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. In: DURAES, M. C.; MARTINS, C. E.; DERESZ, F.; BRITO, J. R. F.; FREITAS, A. F.; PORTUGAL, J. A. B.; COSTA, C. N. **Anais Minas Leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. p. 83-94.

BUCZINSKI, S. et al. Use of ATP luminometry to assess the cleanliness of equipment used to collect and feed colostrum on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Nova Iorque, v. 105, n. 2, p. 1638-1648, fev. 2022. Available from: <<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21023>>. Accessed: Set. 5, 2022.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. **Contagem Bacteriana Total (CBT)**. Piracicaba: Clínica do Leite – ESALQ/USP; 2016 (Mapa da Qualidade do Leite, v. 2). 42 p. Available from: <[https://www.embrapa.br/documents/1354377/39803784/CBT\\_MapadaQualidade\\_Clin-Leite.pdf/ad95f20a-e103-d244-c394-e9e25e90dbf9?version=1.0](https://www.embrapa.br/documents/1354377/39803784/CBT_MapadaQualidade_Clin-Leite.pdf/ad95f20a-e103-d244-c394-e9e25e90dbf9?version=1.0)>. Accessed: Nov. 3, 2022.

DUFOUR, M. et al. Development of laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of “natural” antimicrobials against dairy biofilms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 7, p. 1438-1443, fev. 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 192 p.

IRIE, Y. et al. Cleaning procedures and cleanliness assessments of bucket milkers and suckling buckets on Japanese dairy farms. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v. 83, n. 5, p. 863-868, jun. 2021.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001, p. 69-82.

LATORRE, A. A. et al. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Dairy Science**, Nova Iorque, v. 93, n. 6, p. 2792-2802, jun. 2010.

MACHADO, N. J. B. et al. Caracterização da qualidade microbiológica do leite cru de propriedades do município de Parintins-AM. **Revista de Ciências Agrárias**, Parintins, v. 55, n. 4, p. 327-331, out.-dez. 2012.

PALIY, A. et al. Determining the efficiency of cleaning a milk line made from different materials from contaminants. **Eastern-European Journal of Enterprise Technologies**, v. 4, n. 1, p. 76-85, jun. 2021. Available from: <<https://ssrn.com/abstract=3917915>>. Accessed: Fev. 10, 2023.

PERKINS, N. R. et al. An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash quality on dairy farms in Ontario (Canada). **Journal of Dairy Science**, Nova Iorque, v. 92, n. 8, p. 3714-3722, ago. 2009.

RYU, S. et al. Bacterial quality, prevalence of pathogens, and molecular characterization of biofilm-producing *Staphylococcus aureus* from Korean dairy farm environments. **Animals**, Basel, v. 11, n. 5, p. 1306, abr. 2021. Available from: <<https://www.mdpi.com/2076-2615/11/5/1306>>. Accessed: Set. 5, 2022.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito das bactérias psicotrópicas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SALVADOR, F. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Apucarana-PR e região. **Revista F@pciência**, Apucarana, v. 9, n. 5, p. 30-41, 2012.

SILVA, L. D. et al. Limpeza clean in place (CIP) de diferentes geometrias de aço inoxidável contaminadas com *Pseudomonas fluorescens*. **Research, Society and Development**, [S.l.], v. 9, n. 12, p. e23491210866, 2020. Available from: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/10866>>. Accessed: Dez. 3, 2022.

SILVA, V. A. M. et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite, pasteurizado tipo A e dos pontos de contaminação de uma Granja Leiteira no RS. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 1, p. 51-57, 2009.

SOUAD, R. et al. Assessing hygiene indicators in two dairies in Algeria in producing pasteurized milk. **Veterinary World**, Rajkot, v. 14, n. 9, p. 2317-2324, set. 2021. Available from: < <http://www.veterinaryworld.org/Vol.14/September-2021/4.pdf>>. Accessed: Set. 5, 2022.

ZOU, M.; LIU, D. A systematic characterization of the distribution, biofilm-forming potential and the resistance of the biofilms to the CIP processes of the bacteria in a milk powder processing factory. **Food Research International**, Ottawa, v. 113, p. 316-326, nov. 2018.

## APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

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

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington, DC: APHA, 2001.

BARBOSA, L. G.; RUY, M. J.; OLIVEIRA, A. D.; MARTINS, E. M. F.; MARTINS, C. T. Determinação de coliformes e aplicação de checklist em uma unidade de alimentação pública do Estado de Minas Gerais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 196-197, p. 38-41, mai-jun, 2011.

RODRIGUES, D. S.; FERREIRA, F. C. Avaliação microbiológica de leite pasteurizado produzido em laticínio do município de Januária-MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 30, n. 252-253, p. 122-125. Disponível em: <https://higienealimentar.com.br/252253janfev/>. Acesso em: 5 set. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, p. 3, 30 mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, p. 13-21, 20 set. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel, em conformidade com os anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, p. 6, 29 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, p. 230-231, 26 nov. 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, p. 10, 26 nov. 2018b.

BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F. Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. *In*: DURAES, M. C.; MARTINS, C. E.; DERESZ, F.; BRITO, J. R. F.; FREITAS, A. F.; PORTUGAL, J. A. B.; COSTA, C. N. **Anais Minas Leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. p. 83-94.

CASSOLI, L. D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. 2005. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CAVALVANTI, E. R. C. C.; CAVALCANTI, M. A. R.; SOUZA, W. J.; ARAÚJO, D. G. Avaliação microbiológica em ordenhadeira mecânica antes e após adoção de procedimento orientado de higienização. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 17, n. 1, p. 3-6, 2010.

CLUTTERBUCK, A. L.; WOODS, E. J.; KNOTTENBELT, D. C.; CLEGG, P. D.; COCHRANE, C. A.; PERCIVAL, S. L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 1-17, mar. 2007.

CNI; SENAI; SEBRAE; EMBRAPA. **Boas práticas agropecuárias para produção de alimentos seguros no campo**: perigos na produção leiteira. 2. ed. rev. atual. Brasília, DF: Embrapa Transferência de Tecnologia, 2005. 30 p.

DESMARCHELIER, P. M. Pathogenic microbiological contaminants of milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, North Melbourne, v. 56, n. 2, p. 123-125, 2001.

DIAS, A. M.; SANT'ANA, A. S.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; FERNANDES, C. A. On the implementation of good manufacturing practices in a small processing unity of mozzarella cheese in Brazil. **Food Control**, Oxford, v. 24, n. 1-2, p. 199-205, 2012.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 167-193, abr. 2002.

FARINA, E. M. M. Q.; HUTMAN, G. E.; LAVARELLO, P. J.; NUNES, R.; REARDON, T. Private and public milk standards in Argentina and Brazil. **Food Policy**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 302-315, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 192 p.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 8, n.1, p. 623-633, 2010.

GAN, X.; YANG, B.; WANG, X.; DONG, Y.; HU, Y.; XU, J.; FENGQIN, L. Contamination, persistence and dissemination of *Cronobacter* during the production of powdered infant formula in China in 2016. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, Brisbane, v. 13, n.1, p. 105-114, 2021.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

HAYES, M. C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. *In*: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**. 2. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2001. p. 59-76.

HEBERT, C. J.; ALLES, A. S.; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J. WHEDMANN, M. Evaluation of different methods to detect microbial hygiene indicators relevant in the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, Nova Iorque, v. 99, n. 9, p. 7033-7042, 2016.

HOTT, M. C.; ANDRADE, R. G.; MAGALHÃES, W. C. P. Distribuição da produção de leite por estados e mesorregiões. *In*: EMBRAPA GADO DE LEITE. **Anuário Leite 2021**. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2021. p. 10-13.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa trimestral do leite**. [Brasília, DF], 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21121-primeiros-resultados-2leite.html?=&t=resultados>. Acesso em: 5 set. 2022.

ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganismos em alimentos 8**: utilização de dados para avaliação do controle de processo e aceitação de produto. São Paulo: Blucher, 2015. 522 p.

IRIE, Y.; ONO, M.; ARITSUNE, M.; IMAMURA, Y.; NISHIOKA, S.; AKIYAMA, K.; ENOKIDANI, M.; HORIKITA, T. Cleaning procedures and cleanliness assessments of bucket milkers and suckling buckets on Japanese dairy farms. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v. 83, n. 5, p. 863-868, 2021.

JACQUES, K.; LYONS, T.; KELSALL, D. **The alcohol textbook**. 4 ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. 445 p.

KUHN, E.; MEUNIER-GODDIK, L.; WAITE-CUSIC, J. G. Effect of leaving milk trucks empty and the idle for 6 h between raw milk loads. **Journal of Dairy Science**, Nova Iorque, v. 101, n. 2, p. 1767-1776, 2018.

LELIEVELD, H.; MOSTERT, T.; HOLAH, J. **Handbook of hygiene control in the food industry**. Cambridge: CRC, 2005. 744 p.

LIU, Y.; WANG, C.; SHI, Z.; LI, B. Optimization and modeling of slightly acid electrolyzed water for the clean-in-place process in milking systems. **Foods**, Basel, v. 9, n. 11, p. 1685, nov. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7698708>. Acesso em: 5 set. 2022.

MACHADO, N. J. B.; LAUREANO, M. M. M.; MOTA, D. A.; MATOS, I. T. S. R.; BRASIL, R. J. M.; HOSHIDA, M. A. Caracterização da qualidade microbiológica do leite cru de propriedades do município de Parintins-AM. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 55, n. 4, p. 327-331, 2012.

MELO, L. Modelagem matemática da produção de leite no Brasil: uma aplicação de conhecimentos adquiridos durante o curso de graduação. **Pensar Acadêmico**, Manhuaçu, v. 19, n. 1, p. 87-98, 2021.

MILKPOINT. **Levantamento Top 100 produtores de leite no Brasil**. São Paulo, 2022 Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/top100/2022/>. Acesso em: 5 set. 2022.

NARCIZO, D. K.; MONTANHINI, M. T. M. Ocorrência de *Campylobacter jejuni* em leite cru e pasteurizado comercializado em Curitiba, estado do Paraná, Brasil. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 5, p. 341-347, 2014.

NORTERMANS, S.; DORMANS, J. A. M. A.; MEAD, G. C. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganism in food processing plants: a review. **Biofouling**, Abingdon, v. 5, n. 1-2, p. 21-36, 1991.

OLIVEIRA, J. **Uso de critérios para avaliação da qualidade microbiológica de um laticínio**. 2016. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Laranjeiras do Sul, Laranjeiras do Sul, 2016.

OSTROV, I.; HAREL, A.; BERNSTEIN, S.; STEINBERG, D. SHEMESH, M. Development of a method to determine the effectiveness of cleaning agents in removal of biofilm derived spores in milking system. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, article 1498, 9 p., 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01498/full>. Acesso em: 13 set. 2022.

RODRIGUES, D. S.; FERREIRA, F. C. Avaliação microbiológica de leite pasteurizado produzido em laticínio do município de Januária-MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 30, n. 252-253, p. 122-125, 2016. Disponível em: <https://higienealimentar.com.br/252253janfev/>. Acesso em: 5 set. 2022.

RYU, S.; SHIN, M.; YUN, B.; LEE, W.; CHOI, H.; KANG, M.; OH, S.; KIM, Y. Bacterial quality, prevalence of pathogens, and molecular characterization of biofilm-producing *Staphylococcus aureus* from Korean dairy farm environments. **Animals**, Basel, v 11, n. 5, p. 1306, abr. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/5/1306>. Acesso em: 5 set. 2022.

SANTOS, A. L. **Implantação de um procedimento de higienização em uma unidade produtora de queijo minas artesanal na região da Canastra e avaliação pelo método de ATP-bioluminescência**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito das bactérias psicotrópicas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p.13-19, mar. 2001. Disponível em: <https://higienealimentar.com.br/82-2/>. Acesso em: 5 set. 2022.

SHI, X.; ZHU, X.; Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 20, n. 9, p. 407-413, 2009.

SILVA, L. D.; MOREIRA, M. G.; GUERRA, N. T.; NAVES, E. A. A.; VIANNA, P. C. B.; FILHO, U. C. Limpeza *clean in place* (CIP) de diferentes geometrias de aço inoxidável contaminadas com *Pseudomonas fluorescens*. **Research, Society and Development**, [S.l.], v. 9, n. 12, p. e23491210866, 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/10866>. Acesso em: 03 dez. 2022.

SIQUEIRA, I. N.; LIMEIRA, C. H.; CAVALCANTI, A. A. C.; SOUZA, J. G.; AZEVEDO, S. S.; MELO, M. A.; FREIRE, D. H. F. Bactérias formadoras de biofilmes na indústria de laticínios: uma breve revisão. **Ensaio e Ciência C Biológicas, Agrárias e da Saúde**, [S.l.], v. 25, n. 4, p. 491-500, 2021. Disponível em: <https://ensaioseciencia.pgsskroton.com.br/article/view/8580>. Acesso em: 13 set. 2022.

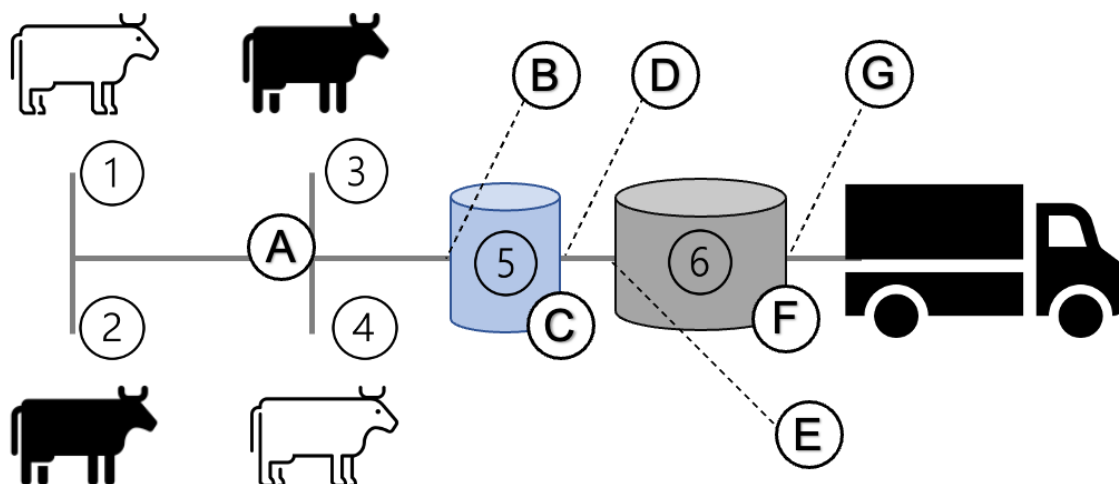
TAMIME, A. **Cleaning-in-place: Dairy, Food and Beverage Operations**. 3 ed. Oxford: Blackell Publishing, 2008. 272 p.

TEH, K. H.; FLINT, S.; BROOKS, J.; KNIGHT, G. **Biofilms in the dairy industry**. Oxford: Wiley, 2015. 288 p.

VILELA, D.; RESENDE, J. C.; LEITE, J. B.; ALVES, E. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, DF, v. 26, n. 1, p. 5-24, jan. 2017.

## APÊNDICE B – INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Figura 1 - Layout simplificado da linha de ordenha mecanizada (números) e pontos de coleta do teste de esfregaço (letras)

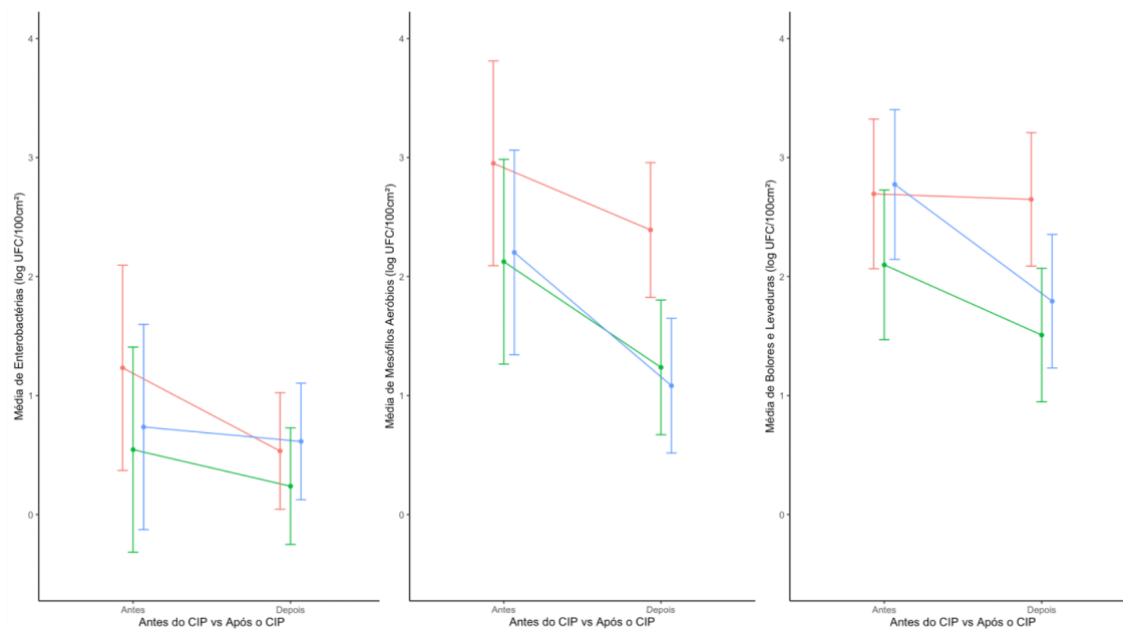


1, 2, 3 e 4 – Ordenhadeiras mecânicas, 5 – Tanque intermediário, 6 – Tanque de armazenamento e resfriamento de leite.

A – Interior da ordenhadeira, B – Entrada do tanque intermediário, C – Interior do tanque intermediário, D – Saída do tanque intermediário, E – Entrada do tanque de armazenamento, F – Interior do tanque de armazenamento e G – Saída do tanque de armazenamento.

Fonte: Elaborado pelo Autor.

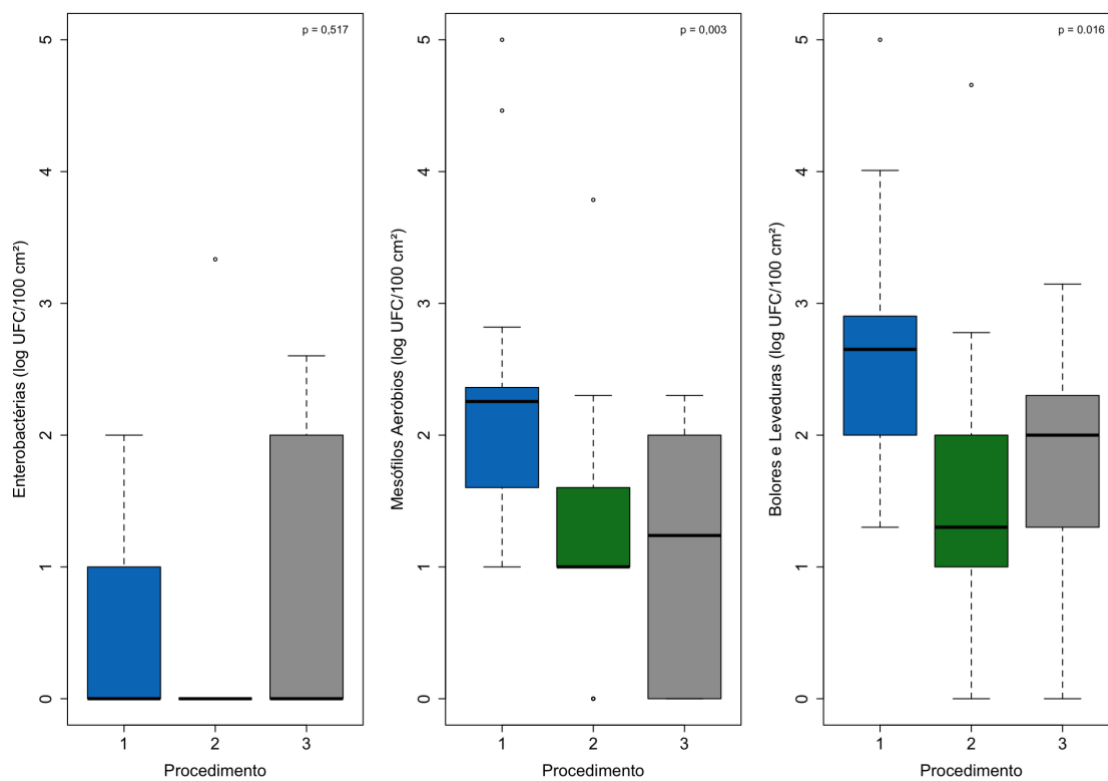
**Figura 2 - Médias obtidas antes e depois do procedimento de limpeza CIP para contagens de enterobactérias, bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias facultativas viáveis e bolores e leveduras (escala logarítmica).**



Procedimento 1 - 70 °C/20 minutos; Procedimento 2 - 75 °C/20 minutos; Procedimento 3 - 70 °C/25 minutos.

Fonte: Elaborado pelo Autor.

**Figura 3 - Boxplot para cada metodologia e cada grupo microbiano dos resultados obtidos após o processo de higienização (escala logarítmica).**



Procedimento 1 - 70 °C/20 minutos; Procedimento 2 - 75 °C/20 minutos; Procedimento 3 - 70 °C/25 minutos.

Fonte: Elaborado pelo Autor.

**Tabela 1 - Contagens de enterobactérias, bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias facultativas viáveis e bolores e leveduras (médias  $\pm$  desvios padrões) após a aplicação dos procedimentos de higienização e o respectivo percentual de redução no comparativo antes e após o CIP.**

Grupo Microbiano (log UFC/mL)	Média $\pm$ Desvio Padrão após CIP (% de redução)			p valor
	Metodologia			
	1 (70 °C/20 min)	2 (75 °C/20 min)	3 (70 °C/25 min)	
Enterobactérias	0,534 $\pm$ 0,793 (99,94%)	0,238 $\pm$ 0,891 (84,00%)	0,614 $\pm$ 1,018 (14,29%)	0,517
Bactérias Mesófilas Aeróbias	2,392 $\pm$ 1,109 <sup>a</sup> (88,25%)	1,236 $\pm$ 1,002 <sup>b</sup> (94,31%)	1,082 $\pm$ 1,025 <sup>b</sup> (91,04%)	0,003
Bolores e Leveduras	2,648 $\pm$ 0,953 <sup>a</sup> (67,66%)	1,508 $\pm$ 1,180 <sup>b</sup> (58,36%)	1,793 $\pm$ 0,962 <sup>ab</sup> (81,45%)	0,016

Procedimento 1 - 70 °C/20 minutos; Procedimento 2 - 75 °C/20 minutos; Procedimento 3 - 70 °C/25 minutos; a,b Valores na mesma linha apresentando letras diferentes diferem entre no teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), UFC = Unidades formadoras de colônias.

Fonte: Elaborado pelo Autor.

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIÊNCIA RURAL

### ESCOPO:

**1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

**2.** Os **artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1o rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

### Empresas credenciadas:

- American Journal Experts (<http://www.journalexerts.com/>) - Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
- BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>) - Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
- Editage (<http://www.editage.com.br/>)
- Editione (<http://www.editione.com>)
- Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates. - GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)
- JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
- Liberty Medical Communications (<http://libertymedcom.com/>)
- Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
- Quality Proofreading Services UK (<https://londonproofreaders.co.uk/>)
- Readytopub (<https://www.readytopub.com/home>)

### LIMITE DE PÁGINAS:

Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras**. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem**.

**Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando manuscritos com páginas adicionais** além dos limites acima. No entanto, os trabalhos aprovados que possuem páginas **excedentes** terão um custo adicional para a publicação (vide taxa).

### ESTRUTURA:

**3. O artigo científico** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão ou resultados/discussão (juntos); Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente, pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

**4. A revisão bibliográfica** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

**5. A nota** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com Introdução; Metodologia; Resultados e Discussão e Conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

#### COVER LETTER:

6. O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos

**submetidos em português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?
- d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte tutorial.

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

#### TÍTULOS:

8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar

abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. Nesse link é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o software **EndNote** (o EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos). Também é disponibilizado nesse link o **arquivo de estilo** para uso com o software **Mendeley**.

## REFERÊNCIAS:

11. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

11.1. Citação de livro: JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

11.2. Capítulo de livro com autoria: GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

11.3. Capítulo de livro sem autoria: COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Wiley, 1977. Cap.4, p.72-90. TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

11.4. Artigo completo: O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017 . Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (Artigo publicado eletronicamente).

**11.5.** Resumos: RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

**11.6.** Tese, dissertação: COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

**11.7.** Boletim: ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

**11.8.** Informação verbal: Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

**11.9.** Documentos eletrônicos: MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available from: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed: Mar. 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Online. Available from: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001(OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available from: <[http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

#### **DESENHOS, GRÁFICOS E FOTOGRAFIAS:**

**12.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos, as figuras e os gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em

qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

**13.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

**14.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

**15.** Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

**16.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

**17.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento. **18.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

**19.** Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por **decurso de prazo** não terão a taxa de tramitação reembolsada.

**20.** Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”.

#### **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:**

##### **21. Contribuição dos autores**

Para se qualificar para a autoria do manuscrito submetido, todos os autores listados deveriam ter contribuições intelectuais substanciais tanto para a pesquisa quanto para sua preparação. Por favor, use um dos exemplos abaixo ou faça o seu.

##### **Exemplo um**

RW, RA e RCNO conceberam e projetaram experimentos. WC, LM e AA realizaram os experimentos, BB realizou as análises laboratoriais. BB supervisionou e coordenou os experimentos com animais e forneceu dados clínicos. BB realizou análises estatísticas de dados experimentais. WC, MB e NO prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

##### **Exemplo dois**

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

##### **Exemplo três**

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito

##### **ORCID:**

**22. O ORCID** (Open Research and Contributors Identification) permite a criação de identificadores digitais únicos (ORCID ID) para pesquisadores, facilitando a identificação nacional e internacional do pesquisador e sua produção. Dessa forma **recomendamos** que todos os autores de cada submissão adotem o registro **ORCID** em suas publicações.

#### **CIÊNCIA ABERTA:**

**23.** A Ciência Rural vem se alinhando às práticas de comunicação da Ciência Aberta, em atendimento ao promovido pelo Programa SciELO. Por isto, a partir de 01/01/2022 os autores devem fazer uso do Formulário sobre Conformidade com a Ciência Aberta que deverá ser submetido como arquivo suplementar a todo manuscrito submetido na Ciência Rural. A conformidade informada pelos autores será verificada na revisão inicial dos manuscritos e posteriormente pelos editores e pareceristas. Informamos aos autores que os artigos publicados no fascículo v52n1 já irão conter a identificação dos editor-chefe e editor de área responsáveis pela tramitação dos manuscritos na CR, conforme orientado pelas práticas da Ciência Aberta.

**24.** Ciência Rural (CR) recomenda a todos os autores depositar preprints para acelerar a circulação de dados de artigos antes da avaliação por pares. Caso uma pesquisa com um preprint for aceita para publicação na CR, o preprint e o manuscrito publicado serão ligados um com o outro na publicação online. Todos os autores deverão ligar seu respectivo ORCID tanto ao preprint como ao manuscrito publicado.

CR também recomenda editores a considerar os comentários e informações disponíveis no preprint para suportar o processo editorial e, quando relevantes, editores podem incorporar as informações na decisão editorial aos autores.

CR recomenda integralmente repositórios de preprint tais como BioRxiv, AgriRxiv e SciELO Preprints.

#### **POLÍTICAS DE ACESSO ABERTO, DIREITOS AUTORAIS E AUTOARQUIVAMENTO:**

**25.** Todo o conteúdo da Ciência Rural e os artigos publicados pela revista, exceto onde explicitada de outra forma, estão licenciados sob a licença Creative Commons Attribution. Autores de artigos publicados pela Ciência Rural mantêm os direitos autorais de seus trabalhos, licenciando-os sob a licença Creative Commons Attribution, que permite que os artigos sejam reutilizados e distribuídos sem restrição, desde que o trabalho original seja corretamente citado.

A Ciência Rural encoraja os autores a autoarquivar seus manuscritos aceitos, publicando-os em blogs pessoais, repositórios institucionais e mídias sociais acadêmicas, bem como postando-os em suas mídias sociais pessoais, desde que seja incluída a citação completa à versão do website da revista