



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

MÔNICA DIAS ROCHA CHAVES

INCIDÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE SALMONELLA
SPP. EM AMOSTRAS DE SOJA E DERIVADOS NO BRASIL.

CAMPINAS
2017

MÔNICA DIAS ROCHA CHAVES

**INCIDÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE SALMONELLA
SPP. EM AMOSTRAS DE SOJA E DERIVADOS NO BRASIL.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciência de
Alimentos da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do
título de mestra em Ciência de
Alimentos.

Orientador: ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MÔNICA
DIAS ROCHA CHAVES E
ORIENTADA PELO PROF. DR.
ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA

CAMPINAS
2017

Agência: CAPES

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

C398i Chaves, Mônica Dias Rocha, 1989-
Incidência, caracterização e sobrevivência de *Salmonella* spp. em amostras de soja e derivados no Brasil / Mônica Dias Rocha Chaves. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Salmonella*. 2. Soja. 3. Contaminação. 4. Ração animal. I. Sant'Ana, Anderson de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Incidence, characterization and survival of *Salmonella* spp. in soybeans samples and derivatives in Brazil

Palavras-chave em inglês:

Salmonella

Soybean

Contamination

Animal feed

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Títuloção: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Anderson de Souza Sant'Ana [Orientador]

Uelinton Manoel Pinto

Ana Carolina Bortolossi Rezende

Data de defesa: 02-05-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana
Universidade Estadual de Campinas
Orientador

Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto
Universidade de São Paulo
Membro titular

Dra. Ana Carolina Bortolossi Rezende
LABTERMO - Fundação André Tosello
Membro titular

Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes
Universidade Estadual de Campinas
Membro suplente

Profa. Dra. Maristela da Silva do Nascimento
Universidade Estadual de Campinas
Membro suplente

A ATA da defesa, com as respectivas assinaturas dos membros,
encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho inteiramente ao meu marido, minha mãe e minha afilhada.

RESUMO

Incidência, caracterização e sobrevivência de *Salmonella* spp. em amostras de soja e derivados no Brasil

Salmonella ainda figura como um dos patógenos mais envolvidos em caso de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no mundo. Os sintomas causados, variando de leves a moderados, são responsáveis por milhares de hospitalizações anualmente, causando prejuízos de ordem econômica e de saúde pública. Devido à sua capacidade de sobrevivência em diferentes ambientes e resistência a condições de estresse, *Salmonella* pode ser encontrada nos mais variados substratos, como carnes, vegetais e grãos. O Brasil é um dos principais exportadores de produtos agropecuários do mundo, tendo como um dos seus pilares econômicos a soja. As chamadas “indústrias de beneficiamento de soja” exportam grande parte de sua produção na forma grãos e farelo, e a presença de patógenos na linha de processamento pode acarretar na perda de safras inteiras. Tendo em vista este cenário, esta pesquisa buscou avaliar a presença de *Salmonella* desde a matéria-prima (grão de soja) até o produto final (farelo) de 5 indústrias beneficiadoras de soja brasileiras. Amostras oriundas do ambiente interno e externo das fábricas também foram analisadas. Além disso, análises de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) foram conduzidas a fim de se determinar se a presença de populações ao longo da linha de processamento era persistente ou advinda de contaminação cruzada. Por fim, a análise da curva de sobreviventes de *Salmonella* em grãos de soja foi realizada a partir de experimentos conduzidos em diferentes temperaturas. Foram identificados 29 sorotipos de *Salmonella* a partir de 713 amostras analisadas. O sorotipo Mbandaka foi prevalente, e mostrou ser oriundo de um mesmo clone em uma das indústrias analisadas, indicando persistência ao longo do processamento. Os experimentos de microbiologia preditiva indicam que a temperatura de 20°C seria capaz de manter células viáveis por mais de 60 dias. Os resultados obtidos neste estudo mostram que os parâmetros de higienização, além do controle de pragas adotados pelas indústrias analisadas, não são satisfatórios, sendo necessária a aplicação mais rígida dos padrões.

Palavras chaves: *Salmonella*; soja; ração animal; contaminação

ABSTRACT

Incidence, characterization and survival of *Salmonella* spp. in samples of soybeans and derivatives in Brazil

Salmonella still figures as one of the most involved pathogens in Foodborne Diseases (FBD) outbreaks around the world. The symptoms, ranging from mild to moderate, are responsible for thousands of hospitalizations annually, causing economic and public health damage. Due to its ability to survive in different environments and resistance to stress, *Salmonella* can be found in the most varied substrates, such as meats, vegetables and grains. Brazil is one of the main exporters of agricultural products, with soybean as one of its economic pillars. The so-called "soy processing industries" export much of their production in the form of grains and bran, and the presence of pathogens in the processing line can result in whole harvests losses. Considering this scenario, this research sought to evaluate the presence of *Salmonella* from the raw material (soybean grain) to the final product (bran) of 5 Brazilian soybean processing industries. Samples from internal and external factories' environment were also analyzed. In addition, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) analyzes were conducted to determine whether the presence of populations along the processing line was persistent or due to cross-contamination. Finally, the analysis *Salmonella* survivors' curve in soybean grains were performed from experiments conducted at different temperatures. Twenty-nine serotypes of *Salmonella* were identified from 713 analyzed samples. The Mbandaka serotype was prevalent and showed to be from the same clone in one industry, indicating persistence throughout the processing. Predictive microbiology experiments indicate that the temperature of 20 ° C was able to maintain viable cells for more than 60 days. The results obtained in this study show that the hygienization parameters, besides the pest control adopted by the analyzed industries, are not satisfactory, requiring a more rigid application of the standards.

Key words: *Salmonella*; Soy; animal feed; contamination

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	9
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA.....	11
Soja.....	12
Histórico e Utilização do grão	12
Características e definições	12
Importância Econômica	13
Obtenção, transporte e estocagem	14
Processo produtivo de rações animais	16
Importância epidemiológica das rações animais.....	16
Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).....	17
Caracterização do gênero Salmonella	18
Enfermidades resultantes de infecção por Salmonella	23
Ecologia de Salmonella: do farelo e ingredientes à ração animal	24
Resposta ao estresse de micro-organismos em baixa a_w	31
Microbiologia preditiva.....	32
Métodos de Tipagem de Salmonella	37
Referências.....	38
CAPÍTULO 2: INCIDÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE SALMONELLA SPP. EM AMOSTRAS DE SOJA E DERIVADOS NO BRASIL.	47
Introdução	49
Material e métodos.....	50
Resultados	56
Discussão	67
Referências.....	71
DISCUSSÃO GERAL.....	76
CONCLUSÕES GERAIS	78
REFERÊNCIAS GERAIS	80

INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com dados publicados pela ANVISA, ocorreram 6.632 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Brasil nos últimos 10 anos. Aproximadamente 470 mil pessoas foram expostas de alguma maneira às enfermidades, ocasionando em mais de 17 mil hospitalizações e 109 óbitos. Dentre os casos reportados onde o agente etiológico causador da doença é conhecido, *Salmonella* spp. figura como primeiro da lista, correspondendo a aproximadamente 7,5% dos casos elucidados (BRASIL, 2016).

Salmonella é um micro-organismo de origem enteral, que pode ser disseminado para o ambiente através de animais doentes e/ou assintomáticos. A ingestão de alimentos contaminados por células de *Salmonella*, mesmo estas estando em pequeno número, pode levar ao desenvolvimento de gastroenterites, conhecidas popularmente como salmoneloses. Os sintomas podem surgir de forma branda à moderada, com quadros de diarreia e dores abdominais. Em casos mais graves, pode ser verificada diarreia profusa acompanhada de sangue nas fezes (JAY, 2005).

Dentre as características intrínsecas deste micro-organismo está a elevada resistência a suportar diferentes tipos de estresses sub-letais, tais como pasteurizações realizadas com binômio tempo/temperatura inapropriados ou redução da atividade de água por desidratação de substrato. Esta capacidade de sobrevivência de células de *Salmonella* transforma este organismo em “alvo” de processos utilizados por indústrias específicas, como por exemplo, indústrias beneficiadoras de soja (GRUZDEV; PINTO; SELA, 2011; PEDERSEN; OLSEN; BISGAARD, 2008; SHAH, 2011).

A soja é um dos principais produtos de exportação brasileiro, podendo ser comercializada na forma de grãos, óleo e farelo, sendo a China o principal mercado importador do chamado “complexo soja”. Estes ingredientes muitas vezes são utilizados como substrato para a obtenção de outros produtos, como é o caso por exemplo de ração animal, que pode ser produzida a partir do farelo de soja (DEAGRO, 2015; EMBRAPA, 2016). Portanto, atenção especial deve ser dada à toda a cadeia produtiva deste produto, desde aos campos de cultivo, passando pelas indústrias beneficiadoras, transporte, armazenagem e consumo

final. Falhas nos processos operacionais padrões estabelecidos podem acarretar na disseminação de patógenos, possibilitando o aparecimento de surtos de DTA.

As células de *Salmonella* podem ser inseridas no ambiente de produção através da utilização de matéria-prima contaminada, e a partir disso, tornarem-se persistentes na linha produtiva. Outra porta de entrada da bactéria é via contaminação cruzada, ou re-contaminação do produto após o processamento do grão (DAVIES & WALES, 2013; REIJ & DEN AANTREKKER, 2004). A utilização de técnicas apuradas de rastreamento, como o PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), é fundamental para se entender a ecologia e histórico da presença do patógeno nas indústrias alimentícias, possibilitando assim, o desenvolvimento de medidas de controle e prevenção mais apuradas (PELLEGRINI; PAIM; LIMA et al, 2015).

Este trabalho buscou unir as metodologias microbiológicas tradicionais na identificação e isolamento de *Salmonella* em soja com técnicas moleculares de identificação e rastreabilidade, visando determinar a origem da contaminação do produto em questão por este patógeno.

Para alcance do objetivo geral, foram considerados nessa pesquisa, os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a ocorrência de *Salmonella* spp. em diferentes fases da cadeia produtiva da soja, incluindo grãos, ambiente/equipamentos de beneficiamento e derivados (farelo);
- Determinar os perfis genotípicos de cepas de *Salmonella* spp. isoladas em diferentes pontos da cadeia produtiva da soja, incluindo grãos, ambiente/equipamentos de beneficiamento e derivados (farelo);
- Estudar a sobrevivência de *Salmonella* Senftenberg em grãos de soja.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

Soja

Histórico e Utilização do grão

A soja é um grão originário do Oriente e utilizado há mais de 5 mil anos na agricultura. Foi introduzido na Europa no século XVIII, e no Brasil, no século XIX. A soja é muito versátil pois pode dar origem a diversos produtos de diversos segmentos, não somente o alimentício, como agroindústria e indústria química (MISSAO, 2006).

No setor agroindustrial, a soja pode ser utilizada para diversos fins, desde a nutrição animal, em forma de rações, como também para alimentação humana. No segmento da alimentação humana, esta utilização pode se dar na forma de grãos, como saladas ou como farelo de soja, para preparação de produtos de panificação, massas, bebidas, cereais, alimentos dietéticos e para bebês. Apesar destas aplicações, uma das principais aplicações da soja é o óleo de soja (PIPOLO et al., 2015).

Características e definições

O grão de soja provém de uma planta da espécie *Glycine max* (L) Merrill (BRASIL, 2007), uma leguminosa de origem oriental (Figura 1). É uma planta herbácea que varia de 60 a 100 cm de estatura e que desenvolve vagens levemente arqueadas de cor verde, sendo que à medida que amadurecem mudam para cor amarelo-pálido. O interior das vagens pode conter de uma a cinco sementes, denominadas grão de soja (NEPOMUCENO; FARIAS; NEUMAIER, 2008)



Figura 1. Planta de soja, com grãos de soja em detalhe (imagem retirada da internet, domínio público).

O pH do grão de soja encontra-se entre 6 – 6,6 (FDA, 2007), o que influencia diretamente no potencial de desenvolvimento microbiano. A umidade recomendada dos grãos de soja para o momento da colheita é de no máximo 14% (BRASIL, 2007). A atividade de água (a_w) é de 0,69 para grãos de soja convencionais e 0,71 para grãos de soja geneticamente modificados (CANÇADO, 2004). Os baixos valores de a_w dos grãos de soja podem permitir a sobrevivência, mas não a multiplicação, de células vegetativas de patógenos em sua superfície.

Importância Econômica

O Brasil é o maior exportador de soja do mundo e o segundo maior produtor, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (DEAGRO, 2015). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a soja é a principal *commodity* brasileira, com exportação aproximada de 55 milhões de toneladas apenas no primeiro semestre de 2016 (CONAB, 2016). O mercado chinês é o principal destino do “complexo soja” (grão, farelo, óleo bruto, refinado e outros), que importa aproximadamente 70% da produção brasileira (CONAB, 2016).

A soja tem seu cultivo realizado em ampla área e a região centro-oeste brasileira é a que possui maior área de plantação, com 46% da área total cultivada no Brasil (CARVALHO et al., 2010; CONAB, 2016). O estado do Mato Grosso é o maior produtor brasileiro, com produção estimada para 2016 de 26 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

Obtenção, transporte e estocagem

O plantio da soja inicia-se pela etapa de semeadura, que no Brasil ocorre normalmente no mês de novembro. O solo pode ser tanto arado e gradeado ou preparado pela técnica de sistema de plantio direto (técnica onde não se retira o solo antes do plantio). A semeadura é feita por maquinário adequado, com espaçamento entre cada local de inserção de sementes previamente definido. As sementes podem ser tratadas com bactérias fixadoras do nitrogênio. Por fim, é realizada a adubação do solo. A colheita mecanizada ocorre em média após 100 - 160 dias, quando a umidade da soja está entre 13 e 15% (AGRIC, 2011). Eventuais perdas nas safras podem ser devidas ao ataque de pragas e insetos, sendo que estes podem ser vetores diretos de contaminação dos grãos por fungos e bactérias (ORLOVSKIS et al., 2015).

Após a colheita, o transporte de soja da lavoura até os armazéns da fazenda ocorre através de carretas. A soja em grão (a granel ou ensacada) é então transportada diretamente para o porto para ser exportada ou levada às indústrias de processamento para serem produzidos óleo e/ou farelo de soja (COELI, 2004). Na Figura 2 apresenta-se um esquema do processo para obtenção do óleo de soja.

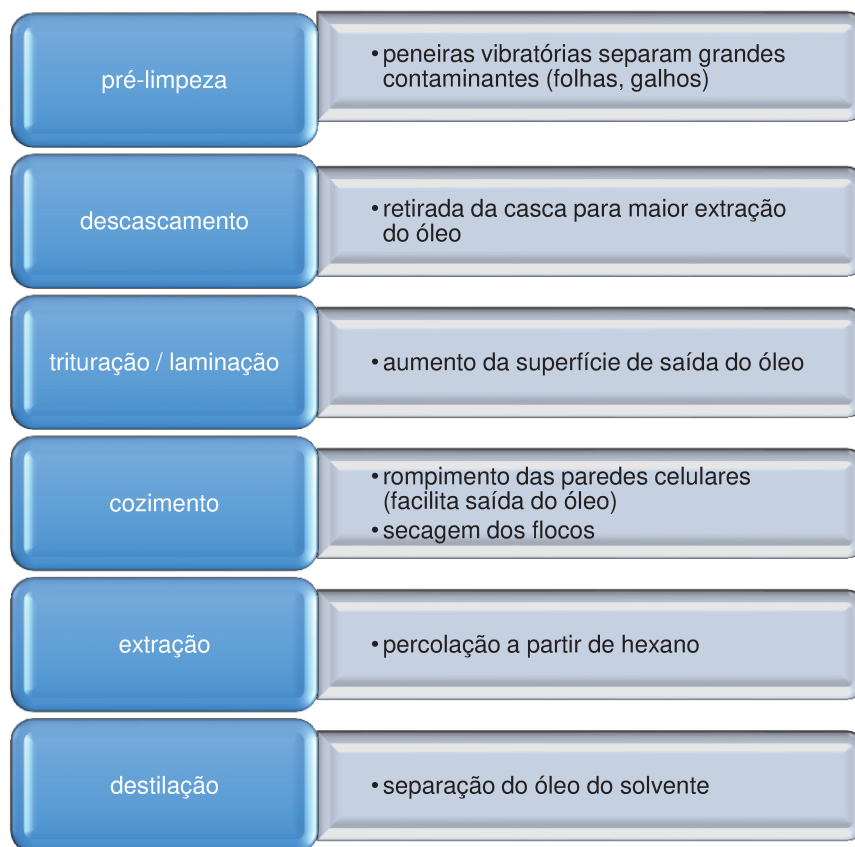


Figura 2. Fluxograma básico de extração de óleo de soja (adaptado de Embrapa, 2001).

O farelo de soja é obtido utilizando-se um dessolventizador-tostador, aparelho que combina evaporação do solvente com cocção úmida. O tempo de permanência do farelo no tostador é de cerca de uma hora, com temperatura mantida entre 85°C e 115°C. Para que o produto seja peletizado, passa por um processo de moagem seguido de secagem e posterior peletização. A etapa final é o resfriamento, onde umidade e temperatura específica de armazenamento são atingidos (GUIMARÃES JÚNIOR, 2003; MANDARINO; ROESSING, 2001; PUKASIEWICZ; OLIVEIRA; PILATTI, 2004).

O farelo de soja é a maior fonte de proteína utilizada em ração para gado, suínos, aves, peixes e *pets* devido à sua excelente composição de

aminoácidos, alto grau de digestibilidade e disponibilidade durante todo o ano (WILLIS, 2003).

Processo produtivo de rações animais

O processo produtivo de rações se inicia pelo recebimento da matéria-prima (milho, farelo de soja, farelo de trigo, sorgo, entre outros) e análise do padrão de qualidade pré-estabelecido. O material a granel é despejado dos caminhões diretamente para a moega, que por sua vez levará os materiais através de elevadores para pesagem antes da mistura. Em seguida, são moídos até atingirem a forma de farelo (CARVALHO, 2013).

Para que as rações possuam valores nutricionais adequados para a alimentação animal, é necessária a adição de micronutrientes (também chamados de núcleos) ao produto final. Os núcleos, além de fornecerem fatores essenciais ao desenvolvimento dos animais, tem a função de melhorar a absorção de outros nutrientes e incrementar o sistema imune (LARA, 2010). Os micronutrientes são dosados e adicionados ao farelo na etapa do misturador.

No misturador, os núcleos e os farelos são misturados pelo tempo necessário até sua perfeita homogeneização (CARVALHO, 2013). Após esse processo, o produto pode ser direcionado ao ensaque, onde ainda pode ser submetido ao processo de peletização ou extrusão.

Importância epidemiológica das rações animais

Na produção primária, as rações parecem ser uma das principais fontes de introdução de *Salmonella*, causando a infecção de rebanhos produtores de aves e ovos. Entretanto, em rebanhos onde a prevalência desta bactéria é alta, não é possível quantificar a contribuição da ração para esse cenário (EFSA, 2008).

A importância da qualidade microbiológica da ração utilizada para alimentar os animais é primordial, pois os mesmos sorotipos de *Salmonella* isolados de infecções clínicas são frequentemente isolados de rações animais (CDC, 2016; WIERUP; HÄGGBLOM, 2010). Animais alimentados com rações contaminadas podem desenvolver salmoneloses, porém, na maioria das vezes essa assume uma forma assintomática. Por outro lado, a bactéria pode ser disseminada para o ambiente através das fezes dos animais contaminados, infectando animais sadios e consequentemente aumentando a incidência de *Salmonella* no rebanho (EFSA, 2008).

Burns e colaboradores (2014) coletaram amostras de fezes dos animais, água de bebedouros e rações em fazendas de suínos e avaliaram a presença de *Salmonella* spp. Em 90% das fazendas visitadas, *Salmonella* spp. pôde ser detectada a partir de amostras de fezes dos animais ou das rações. Os sorotipos encontrados nas amostras de ração possuíam perfis genéticos idênticos aos recuperados das amostras de fezes e ambientais, indicando a ração como uma possível fonte de contaminação para os animais. Além disso, os autores relataram que os animais não apresentavam sintomas de infecção por *Salmonella*, reforçando o conceito de que podem ser importantes reservatórios e disseminadores da bactéria.

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)

Anualmente, estima-se que as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) sejam responsáveis por 580 milhões de casos estimados mundialmente, ocasionando em mais de 350 mil óbitos (KIRK et al., 2015). A salmonelose é uma das enfermidades mais comuns do mundo, sendo estimados aproximadamente 1 milhão de casos somente nos Estados Unidos, onde os

gastos relacionados à despesas e procedimentos médicos superaram US\$ 3,7 bilhões anuais (USDA, 2016). Já no Brasil, entre 2007 e 2016, foram registrados 6.632 surtos de DTA que acometeram 118.104 pessoas, sendo *Salmonella* o principal agente etiológico envolvido dentre os casos elucidados (BRASIL, 2016) (Figura 3).

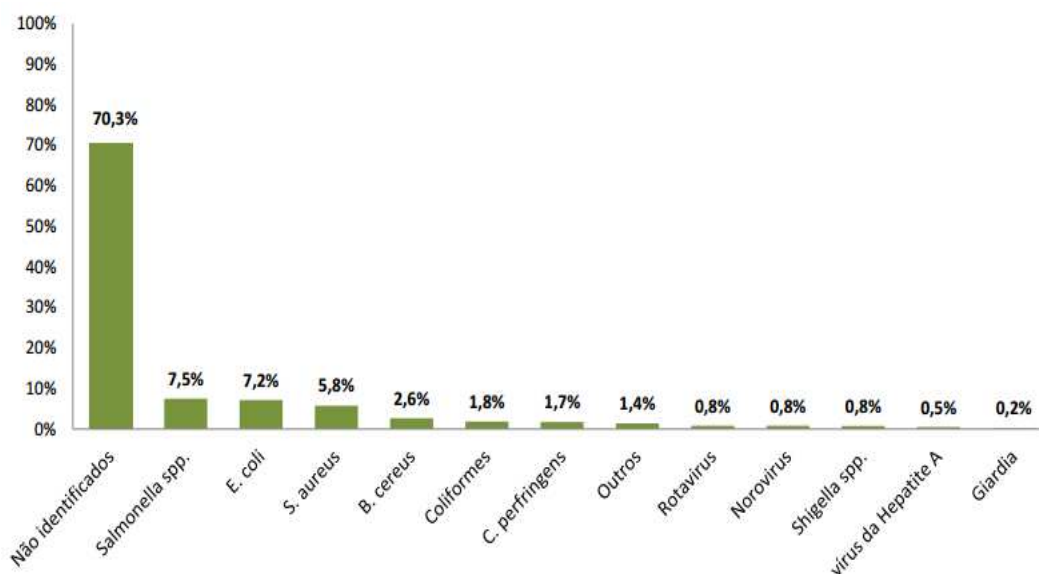


Figura 3. Perfil epidemiológico dos micro-organismos envolvidos em surtos (n= 6,632) de DTA no Brasil, entre 2007 e 2016 (BRASIL, 2016).

Caracterização do gênero *Salmonella*

Bactérias do gênero *Salmonella* são bastonetes Gram-negativos, não-esporulados, anaeróbios facultativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae. O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *enterica* por sua vez, é sub-dividida em 6 subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. O gênero possui ampla variabilidade, sendo conhecidos atualmente mais de 2.500 sorotipos, definidos antígenicamente pelos seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) presentes na bactéria (GRIMONT; WEILL, 2007).

Com o intuito de facilitar a comunicação entre seus pares, os pesquisadores costumam abreviar a nomenclatura de *Salmonella* em seus textos científicos. Por exemplo, *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, sorotipo Typhimurium, pode ser simplesmente grafada como *Salmonella* Typhimurium (BEUCHAT; DOYLE, 2007; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). *Salmonella* Typhimurium é o sorotipo mais comumente isolado no mundo, sendo o fagotipo DT 104 um dos mais estudados, devido à conhecida resistência a antibióticos e sua rápida disseminação no mundo. Entretanto, sua origem e rotas de transmissão ainda permanecem ambíguas (WALTERS, 2014).

As células de *Salmonella* geralmente possuem flagelos peritríquios, porém algumas cepas, como os sorovares Pullorum e Gallinarum, não possuem flagelos (JUNEJA; SOFOS, 2009). São oxidase negativa e catalase positiva, metabolizam carboidrato com produção de ácido e gás e são capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono. Geralmente produzem sulfeto de hidrogênio e descarboxilam lisina e ornitina, entretanto não hidrolisam a ureia. Sua identificação bioquímica geralmente é baseada nestas características (BEUCHAT; DOYLE, 2007). A temperatura ideal para multiplicação de *Salmonella* varia entre 35-37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima 47°C (DOYLE; BUCHANAN, 2013). Embora a atividade de água mínima (a_w) para multiplicação esteja em torno de 0,93, *Salmonella* pode sobreviver por longos períodos em produtos secos ou com baixa a_w , como rações animais, cereais de aveia torrados, pimenta do reino, chocolate, pasta de amendoim e outros produtos desidratados (ADAMS; MOSS, 2008; BEHRAVESH et al., 2010; CDC, 1998; GERMANO; GERMANO, 2015). A Tabela 2 apresenta alguns valores de a_w nos quais a sobrevivência de *Salmonella* tem sido reportada.

Tabela 2. Sobrevivência de *Salmonella* em diferentes valores de a_w .

Sorotipo	Substrato	a _w	Temp. (°C)	Tempo de sobrevivência	Referência
Enteritidis	Halva (doce oriental)	0,17	6-20	8 meses	(KOTZEKIDOU, 1998)
Typhimurium	Chocolate	0,37	20	15 meses	(Tamminga, 1976)
Eastbourne		0,38		19 meses	
Agona, Enteritidis, Montevideo, Tennessee, Typhimurium DT104 (pool)	Biscoito de chocolate	0,14-0,39	25	6 meses	(BEUCHAT; MANN, 2015)
Montevideo Heidelberg	Leite e chocolate em pó	0,43-0,75	25	3,5 meses	(JUVEN et al., 1984)
Typhimurium	Ovo em pó	0,52-0,61	13	2 meses	(JUNG; BEUCHAT, 1999)
Agona Typhimurium	Proteína do soro de leite em pó	0,18	36	6 meses	(FARAKOS; HICKS; FRANK, 2014)
Typhimurium, Heidelberg, Enteritidis, Montevideo, Gaminara	Rações para aves	0,43	38	2,5 meses	(PETKAR et al., 2011)
Chester	Chocolate	0,43	5	> 10 meses	
	Nozes	0,58			
	Chocolate	0,43	25	> 3,5 meses	
	Nozes	0,58			
Typhimurium	Chocolate	0,43	5	> 10 meses	
	Nozes	0,58			
	Chocolate	0,43	25	> 3,5 meses	
	Nozes	0,58			
Typhimurium, Newport, Montevideo (pool)	Tahini	0,17	4 22	4 meses	(TORLAK; SERT; SERIN, 2013)
Enteritidis PT30	Nozes	0,45	23	35 meses	(BLESSINGTON; MITCHAM; HARRIS, 2012)

A habilidade de *Salmonella* em sobreviver em condições adversas, como substratos com baixa a_w foi demonstrada por Wierup e Kristoffersen (2014). Durante 19 anos, 100% dos carregamentos de grãos de soja provenientes da América do Sul destinados a uma empresa de beneficiamento de soja norueguesa apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. As amostras, analisadas por PCR, eram compostas de poeira dos grãos de soja, sendo a média anual de positividade para *Salmonella* de todos os carregamentos oriundos da América do Sul e demais países exportadores em torno de 34% (WIERUP; KRISTOFFERSEN, 2014).

Além de *Salmonella* poder sobreviver em alimentos com baixa a_w , a transmissão de calor é dificultada, o que culmina com um aumento na tolerância ao calor deste micro-organismo. Deste modo, quanto menor a a_w de um alimento, maior será a resistência térmica desta bactéria (GRUZDEV; PINTO; SELA, 2011). A Tabela 3 apresenta parâmetros relacionados à resistência térmica de *Salmonella* em produtos de baixa a_w .

Tabela 3. Resistência térmica de *Salmonella* em produtos de baixa a_w .

Sorotipo	Matriz	a_w	T (°C)	D (min)	Z (°C)	Referência
Anatum	Chocolate ao leite	-	90	11	24,2	(BARRILE; CONE, 1970)
Enteritidis PT30	Grão de amêndoa	0,6	70 80	15,15 1,63	- -	(VILLA-ROJAS et al., 2013)
Typhimurium	Chocolate ao leite	0,5-0,6	73	45	-	(GOEPFERT; BIGGIE, 1968)
		0,45-0,5	73	55	-	
		0,4-0,45	73	-	-	
		0,35-0,4	73	75	-	
Weltvreden	Farinha de trigo	0,3-0,35	70	345	29,2	(ARCHER et al., 1998)
		0,25-0,3	70	165	34,7	
		0,4	61	875	15,2	
Infantis Typhimurium Anatum	Solução aquosa de sucrose	0,87	57,1	26 61,5 83,3	- - -	(CHUNG; GOEPFERT, 1970)
Typhimurium, Tennessee, Agona,	Proteína do soro do leite (pó)	0,19	21 36	6,4 6,48	- -	(FARAKOS; FRANK; SCHAFFNER, 2013)
			21	6,29	-	
		0,29	36	5,57	-	

Montevideo (pool)		0,36	21	7,88	-	
			36	5,12	-	
		0,43	21	5,51	-	
			36	4,69	-	
		0,54	21	-	-	
			36	4,14	-	
Typhimurium				48	-	
Kentucky				66	-	
Anatum	Farinha de	15%***	49	48	-	(VANCAUWENBERGE;
Senftenberg	milho seca			300	-	BOTHAST; KWOLEK,
Cubana				150	-	1981)
Tennessee				594	-	
		0,2		7,05	-	
		0,4	90	2,64	-	
Enteritidis		0,6		3	-	
		0,2		1,20	-	
		0,4	126	0,55	-	
	Pasta de	0,6		0,48	-	(HE et al., 2013)
	amendoim	0,2		3,71	-	
		0,4	90	2,43	-	
Typhimurium		0,6		2,07	-	
		0,2		0,59	-	
		0,4	126	0,28	-	
		0,6		0,76	-	
Tennessee	Pasta de	0,45	71	26,5	-	(MA et al., 2009)
	amendoim		90	8,6	-	
Typhimurium	NB +	0,94	48	46,1	-	(ALJARALLAH;
	glicose				-	ADAMS, 2007)
	NB + NaCl	0,94	48	50,7	-	
Enteritidis	Produto de	0,565		6,15	-	
PT30,	confeitaria				-	
Senftenberg	Carne de	0,383		8,93	-	
775W,	frango (pó)		80		-	(RACHON; PEÑALOZA;
Typhimurium,					-	GIBBS, 2016)
Anatum,	Ração	0,653		0,67	-	
Montevideo,	animal (<i>pet</i>				-	
Tennessee	<i>food</i>)				-	
(pool)					-	
Agona				0,06	6,49	
Anatum				0,68	5,01	
Derby				0,76	6,71	
Montevideo	Xarope de	0,7-0,8	80	0,88	7,02	(GRASSO, 2014)
Senftenberg	milho			0,97	3,54	
Tennessee				0,61	6,23	
Typhimurium				0,60	7,02	
Typhimurium,	Grão de	-	110	4,79	102,60	(NASCIMENTO et al.,
Oranienburg,	cacau					2012)
Senftenberg,	(durante					
Estabourne,	torra)					
Enteritidis	Chocolate	-	50	216,87	-	
(pool)	conchagem	-	70	50,99	-	
Salmonella	Liquor de	-		70	20	(KRAPF;
spp.	cacau		80			GANTENBEIN-
	Chocolate	-		142	14	DEMARCHI, 2010)
	amargo					

* Valor D: Tempo em minutos para primeira redução logarítmica em temperatura constante.

** Valor Z: Temperatura em graus Celsius necessária para redução de 90% do valor D.

*** umidade relativa do ar

Enfermidades resultantes de infecção por *Salmonella*

As doenças causadas por *Salmonella* podem ser separadas em três grupos distintos: Febre tifóide, causada por *Salmonella* Typhi; febre paratifóide causada por *Salmonella* Paratyphi; e salmonelose (gastroenterite) causada por outros sorotipos de *Salmonella* (SHAH, 2011).

A salmonelose é uma infecção gastrointestinal que ocorre em animais e humanos, podendo variar de caráter assintomático até diarreias severas. Tem um período de incubação de 6 a 48 horas e os principais sintomas são febre baixa, náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia, podendo durar alguns dias até uma semana ou mais. Normalmente é auto-limitada, porém em grupos considerados de risco, como crianças, idosos e imunodeprimidos, pode ser mais severa. A dose infecciosa é extremamente baixa, já que uma célula é capaz de causar doença, dependendo da matriz que veiculará a bactéria (HAMMACK, 2012). Alimentos com alto teor de lipídios conferem uma proteção extra contra os ácidos estomacais, favorecendo a passagem da bactéria pelo estômago (ADAMS; MOSS, 2008).

A febre tifóide é uma infecção tanto gastrointestinal quanto sanguínea, ou seja, é uma infecção sistêmica. Tem um período de incubação de 1-3 semanas e seus sintomas incluem febre alta (39-40°C), mal-estar, anorexia, dor de cabeça, prisão de ventre ou diarreia, manchas rosadas no peito e aumento do baço e fígado, sendo que a administração de antibióticos pode ser necessária. A febre paratifóide é semelhante à febre tifóide, porém com sintomas mais

brandos. Assim como na gastroenterite, o indivíduo pode se tornar um portador assintomático, representando papel importante na disseminação da doença, principalmente na indústria de alimentos (WHO, 2003).

Ecologia de *Salmonella*: do farelo e ingredientes à ração animal

A importância dos sorotipos de *Salmonella* e sua associação com alimentos varia de local para local, tipo de alimento, práticas de processamento, obtenção e consumo dos alimentos. Assim, cada sorotipo de *Salmonella* pode possuir diferentes reservatórios, tornando o controle deste micro-organismo mais difícil (JACKSON et al., 2013). Apesar de não ser possível estabelecer uma correlação entre sorotipos de *Salmonella* e alimentos específicos, *S. Enteritidis*, *S. Newport* e *S. Typhimurium* foram os principais sorotipos associados a DTA nos Estados Unidos no período compreendido entre 2010 - 2015 (CDC, 2017). No Brasil, *S. Enteritidis* é o sorotipo mais frequentemente associado a surtos e casos de infecção (CVE/DDTHA, 2011).

O habitat primário de *Salmonella* spp. é o trato intestinal de animais como aves, répteis, animais silvestres, humanos e ocasionalmente insetos, sendo estes últimos importantes vetores. Assim, contato direto ou indireto dos alimentos e/ou superfícies de manipulação e processamento de alimentos com fezes constitui-se uma das principais rotas de contaminação por este patógeno (RAY; BHUNIA, 2013). Além disso, *Salmonella* pode ser isolada a partir de água, solo e esgoto contaminado por material fecal. Através destas fontes, *Salmonella* pode contaminar o ambiente, matérias-primas e/ou alimentos processados, culminando com grandes prejuízos econômicos e sociais (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). A Figura 4 sumariza a complexa relação da *Salmonella* com o ambiente.

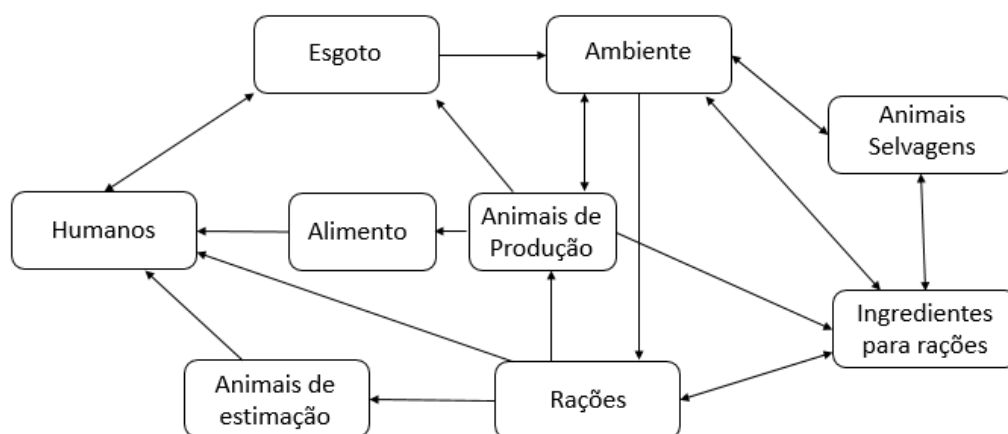


Figura 4: A complexa ecologia de *Salmonella* (Adaptado de ANTOLA, 2013).

Nos Estados Unidos, produtos de origem animal, como carne moída, carne de frango, carne de peru, ovos (aves poedeiras), carne de rã, e produtos de origem vegetal como melões, pasta de amendoim, vegetais folhosos, tomates, manga, pepinos, mamões e broto de alfafa foram incriminados em surtos de salmonelose (CDC, 2017).

No Brasil, os alimentos de origem animal têm grande importância na epidemiologia das salmoneloses, sendo que ovos, carnes, leites, pescados e derivados são incriminados em mais de 40% dos surtos elucidados desta doença (BRASIL, 2014). Uma das razões para a ocorrência desses surtos é a prevalência de *Salmonella* nos rebanhos, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Prevalência de *Salmonella* em rebanhos.

Ano	País	Animal	Amostras analisadas / positivas	Incidência (%)	Referência
2004-2006	Brasil	Carcças de frango	2.679/73	2,72	(MEDEIROS et al., 2011)
2004-2013	Dinamarca	Frangos de corte	37.624/511	1,35	(ANONYMOUS, 2014)
2007	Estados Unidos	Gado leiteiro	4.164/581	13,95	(LOMBARD et al., 2012)
2008	União Européia	Suíno (criadouros)	4.905/363	7,40	(EFSA, 2011)
2009-2010	Brasil	Carcças bovinas	120/4	3,33	(DA SILVA et al., 2014)
2013	Brasil	Suínos confinamento	84/8	9,52	(BOARINI; BERALDO-MASSOLI;
		Linha de abate	84/18	21,42	CASAGRANDE, 2015)

Durante o processamento de alimentos de origem animal, a contaminação por *Salmonella* é passível em etapas como a esfolagem, a evisceração e o resfriamento (PARDI, 2001; RÜCKERT et al., 2009). Mesmo com a implementação de medidas de controle mais rígidas, da adoção das boas práticas de fabricação e do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) durante o processamento, a redução de surtos de salmonelose na maioria dos países ainda é desafiadora. A quantidade de infecções causadas por este micro-organismo não diminuiu significativamente em mais de uma década (CDC, 2011). Portanto, sugere-se que programas efetivos de controle de *Salmonella* se baseiem não somente na redução da contaminação deste micro-organismo durante o processamento de alimentos, mas principalmente na produção primária.

O emprego de medidas preventivas eficazes desde o campo à mesa, tais como prevenção da contaminação durante abate, plantio, processamento e/ou preparo dos alimentos, cocção efetiva; metodologias adequadas de detecção de patógenos; efetiva investigação dos surtos; e políticas de *recall* e recolhimento de produtos bem sucedidas se fazem necessárias (CDC, 2011). Neste cenário, o Brasil torna-se peça chave, uma vez que o país é um dos maiores exportadores de produtos agrícolas (DEAGRO, 2015). A contaminação do farelo de soja proveniente da Escandinávia e da América do Sul, principalmente do Brasil, foi avaliada a pedido de indústrias suecas produtoras de ração para suínos. A presença de *Salmonella* foi confirmada em 14,6% das amostras (WIERUP; HÄGGBLOM, 2010). A pesquisa em questão apontou que 20% das amostras originárias do Brasil foram positivas para o patógeno. A contaminação de matérias-primas para rações animais importadas por empresas europeias também foi relatada por Boqvist e colaboradores (2003), que reuniram informações durante 5 anos e identificaram que o farelo de soja, milho e canola eram os ingredientes que apresentavam maior incidência de *Salmonella*.

Os dados citados corroboram os reportados em pesquisas realizadas no Brasil, principal país de origem das matérias-primas. Soares e colaboradores (2010) analisaram 642 amostras provenientes de plantas processadoras para exportação de farelo de soja, e *Salmonella* foi isolada em 11,2% das amostras de farelo de soja (n=72). A contaminação dos ingredientes acaba se tornando porta de entrada do patógeno para o ambiente de processamento de rações. Esta hipótese pode ser comprovada por Pellegrini e colaboradores (2015) onde sorotipos isolados de ingredientes e amostras ambientais (pó coletado de

equipamentos e instalações) de plantas produtoras de ração animal pertenciam a um mesmo clone.

Condições inapropriadas de estocagem da matéria-prima para produção de ração animal e/ou produto final, podem facilitar o acesso de animais selvagens à linha de processamento (LYNCH; TAUXE; HEDBERG, 2009). Pellegrini (2012) relata incidência de 4,17% de *Salmonella* em amostras de ingredientes estocados a granel, ao passo que os ingredientes ensacados não apresentaram contaminação por esta bactéria. Estudo conduzido por Davies e Wales corroboram esta informação, os quais sugerem que a contaminação da matéria-prima em uma indústria produtora de ração pode ser proveniente de animais selvagens como pombos. Os sorotipos isolados de fezes de pombos foram os mesmos encontrados em algumas amostras de grãos e em locais de recebimento de mercadoria e expedição dos produtos, podendo sugerir contaminação cruzada (2013).

A partir do momento em que as condições de armazenagem da matéria-prima se tornam propícias à multiplicação bacteriana, a população de *Salmonella* pode atingir um número muito elevado de células. Consequentemente, a ração produzida com estes ingredientes torna-se em risco potencial de contaminação de animais (WIERUP; HÄGGBLÖM, 2010). Uma parcela pequena de células de *Salmonella* também podem sobreviver em rações termicamente tratadas, causando a contaminação de frangos jovens (MILNER; SHAFFER, 1952). Episódios de contaminação de rações por *Salmonella* já foram relatados no Brasil. Ao analisarem amostras provenientes de uma fábrica de rações para suínos e aves situada no Estado de São Paulo, Albuquerque e

colaboradores (1999), encontraram a presença do patógeno em 4,5% das rações.

Além de estar relacionada diretamente a animais doentes, ração contaminada também pode vir a ser a fonte da infecção em humanos. A habilidade da *Salmonella* em sobreviver nas rações, infectar os animais e consequentemente causar infecção em humanos é amplamente discutida. Estudo realizado por Hald e colaboradores (2006) faz estrita relação entre sorotipos isolados de infecções humanas e animais com os sorotipos isolados a partir de rações na Dinamarca. Em 4 anos de estudo, 14,4% das infecções humanas foram causadas por sorotipos também encontrados em rações a base de soja. O modelo de risco gerado aponta que o consumo de carne de vaca e porco contaminadas através da ração foi a fonte de contaminação para humanos.

Embora mais raro, o contato com rações animais e *pets* contaminados através de ração pode gerar um surto de salmonelose em humanos. Análises epidemiológicas conduzidas pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) implicaram rações secas para cachorros como a fonte do surto que acometeu 49 pessoas nos Estados Unidos em 2012 (CDC, 2012). Entretanto, as informações encontradas no site do CDC não deixa claro se as pessoas de fato ingeriram a ração ou se adoeceram pelo simples contato com os animais que as ingeriram. A contaminação deste tipo de produto foi previamente descrita na compilação de dados feita por Boqvist e colaboradores (2003), que encontrou 12 amostras de rações para *pets* contaminadas por *Salmonella*.

Além dos ingredientes, existem outros fatores de risco para presença de *Salmonella* nas rações, tais como tratamento térmico ineficiente, água

condensada proveniente de um ambiente com alta umidade e temperatura, presença de vetores e más condições de higiene do ambiente, equipamentos e utensílios. A contaminação cruzada do ambiente de processamento com o produto, intermediário ou final, pode ser derivada da presença de pó decorrente das etapas de recebimento, pré-limpeza dos ingredientes ou de etapas do processo, como a moagem (HÄGGBLUM PER, 2009; JONES, 2011; PELLEGRINI, 2012).

A contaminação ambiental parece ser, de fato, crítica no processamento de ingredientes para rações. Ao analisarem 523 fábricas de ração na Espanha, Torres e colaboradores (2011) conseguiram isolar *Salmonella* spp. a partir de 28% delas (n=144). Nesse estudo foram analisadas 1579 amostras de matéria-prima para ração animal (farelo de soja, grãos de cevada, farelo de girassol, farelo de peixe, milho, farelo de trigo, semente de algodão, farinha de trigo e outros), 1658 amostras de alimento composto e 607 amostras de pó dos equipamentos e instalações das fabricas, totalizando 3844 amostras. *Salmonella* foi encontrada em 4,8% das amostras (n=185). A maior incidência de *Salmonella* (12,5%, n=75) se deu nas amostras ambientais de poeira dos equipamentos e instalações da fábrica, seguido pelas matérias-primas.

Maiores informações sobre a contaminação e locais de incidência de *Salmonella* ao longo da linha de produção são necessárias. A presença de células viáveis de *Salmonella* na matéria-prima, como por exemplo grãos de soja, pode implicar em contaminação posterior nas linhas de processamento de produtos como farelo e ração. As características intrínsecas de *Salmonella*, como resistência aumentada frente a estresses oriundos do processamento,

aliadas ao caráter ubíquo do gênero, tornam necessários estudos mais profundos com relação ao rastreamento. Estudos nos quais técnicas como *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE) são empregadas, podem fornecer informações importantes sobre a ecologia e epidemiologia das salmonellas. A presença de um mesmo clone em diferentes pontos da linha de processamento (ou até mesmo produto final) originário da matéria-prima pode indicar persistência de uma determinada cepa e a necessidade de adoção de medidas de controle específicas, visando-se reduzir a contaminação do produto final e proteger a saúde pública e animal.

Resposta ao estresse de micro-organismos em baixa a_w

Embora a baixa atividade de água em um alimento seja capaz de reduzir a multiplicação e metabolismo microbiano, o processo de desidratação por sua vez provoca respostas ao estresse que além de aumentarem a resistência da *Salmonella* a outros fatores ambientais, culminam também com uma maior capacidade de sobrevivência no alimento. A este fenômeno se dá o nome de proteção cruzada: o tratamento térmico pode conferir resistência bacteriana aos ácidos estomacais permitindo que *Salmonella* chegue ao intestino (DENG; LI; ZHANG, 2012). Outra consequência da resposta ao estresse é a super-expressão de genes de virulência, agravando o quadro clínico da doença no caso de infecção (AVILES et al., 2013; SIRSAT et al., 2011). Alguns destes genes de virulência estão sob controle do fator sigma RpoS e são expressos no começo da fase estacionária, fazendo com que nesta fase as células de *Salmonella* sejam mais virulentas (DODD; RICHARDS; ALDSWORTH, 2007). Entretanto, em resposta a diferentes níveis de estresse como exposição ao calor, choque osmótico, estresse oxidativo e ausência de

nutrientes, a expressão gênica pode ocorrer antes ou durante a fase exponencial da multiplicação bacteriana (DODD; RICHARDS; ALDSWORTH, 2007; SPECTOR; KENYON, 2012).

Considerando-se o exposto acima, tem-se que devida atenção deve ser dada a soja e seus derivados, pois o processo produtivo de farelo de soja e rações lança mão de processos térmicos e diversas etapas de secagem, os quais podem levar as células de *Salmonella* a responderem ao estresse através da expressão de mecanismos de proteção cruzada a outros fatores de estresse. Tal hipótese é corroborada por dados que indicam que cepas de *Salmonella* provenientes de casos clínicos e que foram previamente expostas à desidratação apresentaram maior resistência ao tratamento térmico com calor seco a 100°C do que células não expostas à desidratação prévia (GRUZDEV; PINTO; SELA, 2011)

Quando presente em alimentos de baixa a_w , *Salmonella* possui resistência aos tratamentos térmicos incrementada (DENG; LI; ZHANG, 2012; HE et al., 2013). A potencial resistência cruzada e maior virulência que as cepas de *Salmonella* podem apresentar devido às condições de estresse observadas durante o processamento de soja, farelo e rações, é de crucial importância para a indústria de rações e, conseqüentemente, para a indústria de alimentos. A utilização de rações contaminadas para alimentação de animais pode ser uma fonte de introdução deste patógeno na cadeia produtiva dos alimentos, tendo importância significativa na epidemiologia de *Salmonella* (YANG et al., 2016).

Microbiologia preditiva

A demanda por produtos seguros e saudáveis aumentou, na medida em que surtos de DTA começaram a ser noticiados pela mídia, tornando o

consumidor mais consciente e exigente em relação aos alimentos por ele adquiridos (MCMEEKIN et al., 1993; MUÑOZ-CUEVAS; METRIS; BARANYI, 2012). A abordagem tradicional em estudos relacionados à segurança de alimentos envolve aspectos de microbiologia clássica, que são por vezes muito laboriosos e onerosos (BARANYI; ROBERTS, 1995). Estudos de vida de prateleira, ou até mesmo investigações envolvendo surtos de DTAs, podem levar dias para uma conclusão. O emprego de “*challenge tests*”, comumente usados nestas pesquisas, é muito criticado, uma vez que é praticamente impossível cobrir todas as combinações e variáveis utilizadas pelas indústrias na formulação de seus produtos (DEVLIEGHERE et al., 2009; MCDONALD; SUN, 1999). Neste cenário, torna-se necessário a implementação de metodologias que possam aliar confiabilidade e rapidez de resultados.

Visando suprir essa carência, o conceito de ‘microbiologia preditiva’ surge como aliado dos microbiologistas de alimentos. Unindo disciplinas como matemática, estatística e microbiologia propriamente dita, esta abordagem permite a substituição de análises tradicionais por avaliações baseadas em modelos matemáticos, o que resulta em excelente custo-benefício (MCMEEKIN et al., 2002; WALLS; SCOTT, 1997). Entretanto, o grande ‘boom’ deste ‘novo’ ramo da microbiologia de alimentos se deu entre o fim da década de 1980 e início da década de 1990, com o advento de ferramentas computacionais mais avançadas e de fácil utilização (*user friendly*) (BUCHANAN, 1993a).

A microbiologia preditiva é baseada na premissa de que o comportamento microbiano frente a alterações no ambiente é reprodutível (ROSS; MCMEEKIN, 1994). Este conhecimento pode ser descrito através de modelos matemáticos usados para medir, quantitativamente, diversos aspectos

como crescimento e/ou inativação bacteriana, sobrevivência de parcela da população, produção de toxinas e/ou outros metabólitos, etc. (DEVLIEGHERE et al., 2009).

A primeira tentativa de predição do comportamento microbiano relatada pela literatura científica moderna remete aos experimentos conduzidos por Bigelow e Esty, em 1920 (1920). Em sua pesquisa, uma nova metodologia para se determinar o ponto de morte térmica de esporos resistentes à altas temperaturas foi descrita. A partir de seus resultados, um modelo empírico foi gerado, e a influência da temperatura na cinética das reações pode ser explicada. O modelo que passou a ser conhecido como ‘equação de Bigelow’ pode ser visualizado na equação 1.

$$\text{Eq. 1 } D_T = D_{T_{ref}} 10^{(T_{ref}-T)/z}$$

Onde, z (C°) é a variação de temperatura (Celsius) necessária para modificar o valor de D por um fator de dez (10) e $D_{T_{ref}}$ (min) o valor D à temperatura T_{ref} .

Embora o desenvolvimento de novos modelos tenha se dado desde então, o ano de 1983 é considerado por muitos como o marco inicial da microbiologia preditiva, com a publicação do artigo ‘Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems’ de Roberts e Jarvis (1983).

Historicamente, os modelos preditivos podem ser divididos em 3 níveis: *primário*, que são modelos que descrevem a multiplicação (modelos de crescimento) ou sobrevivência (modelos de inativação) em função do tempo são usados para se obter parâmetros acerca do comportamento microbiano, em condições específicas; *secundário*, que são modelos que descrevem o impacto

das variações ambientais sobre os parâmetros primários; e *terciário*, que são modelos primários, secundários, ou até mesmo combinação de ambos, implementados em programas computacionais com o objetivo de facilitar e disseminar a microbiologia preditiva (BUCHANAN, 1993b). Os modelos podem ainda ser ‘determinísticos’, onde há relação direta entre as variáveis de resposta e as variáveis exploratórias (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000), ou ‘estocásticos’, onde a resposta esperada desvia da observada devido ao estado fisiológico das células e/ou variabilidade entre as linhagens (BARANYI; ROBERTS; MCCLURE, 1993; KOUTSOUMANIS; LIANOU, 2013).

Os cálculos utilizados para se determinar a eficiência de tratamentos térmicos geralmente são baseados na premissa de que a cinética de inativação seja linear (MAFART et al., 2002). Entretanto, a maioria das curvas de sobreviventes não segue esse padrão, podendo apresentar concavidades para baixo (presença de ‘ombro’) ou para cima (presença de ‘cauda’). Estas alterações na linearidade podem ser o resultado de diversos aspectos, como variabilidade nas linhagens e sensibilidade às alterações ambientais (PELEG; COLE, 1998). Afim de se obter predições mais precisas acerca do comportamento microbiano não linear, Mafart e colaboradores (2002) propuseram uma adaptação no método de Bigelow baseado nas distribuições de Weibull (WEIBULL, 1951) para avaliar a eficiência de tratamentos térmicos (eq. 2).

$$Eq. 2 \log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p$$

Onde, N é $\log_{10}$ UFC/g; t é tempo (dias), p é parâmetro de curvatura (adimensional) e delta é tempo para a primeira redução decimal (dias).

A partir de meados dos anos 2000, uma nova abordagem começa a ganhar força, onde o estudo a partir de células individuais, e não da população como um todo, surge como expoente. De fato, se levarmos em consideração que a contaminação de alimentos por micro-organismos, especialmente patógenos, geralmente ocorre a partir de um número baixo de células, ensaios de microscopia '*single cell*' se tornam muito frutíferos (KOUTSOUMANIS; ASPRIDOU, 2016).

Em alimentos com baixa a_w , o comportamento de patógenos como *Salmonella* em função do tempo é normalmente caracterizado por desvios da cinética log-linear. Desta forma, as curvas são caracterizadas por uma parcela de população resistente e descrita pelo modelo como a "cauda" (FARAKOS; SCHAFFNER; FRANK, 2014).

Estudos com produtos expostos a diferentes faixas de temperatura são de vital importância, uma vez que a partir dos dados obtidos pode ser possível prever a sobrevivência / persistência de determinado patógeno ao longo do processo produtivo. A variação de temperatura possivelmente ocorrida durante a cadeia produtiva pode gerar variabilidade entre as linhagens de *Salmonella*, acarretando no aparecimento de sub-populações mais resistentes aos processos de inativação empregados (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2013; MACKEY; DERRICK, 1987). Eventualmente, células sobreviventes poderão ser isoladas a partir do produto final, aumentando a probabilidade de ocorrência de surtos de DTAs e perdas econômicas para o setor.

Métodos de Tipagem de *Salmonella*

Para se estudar a epidemiologia de infecções por *Salmonella*, é necessário a utilização de métodos confiáveis para se caracterizar isolados de um mesmo sorotipo.

Em virtude da existência dos mais de 2.500 sorotipos, diversas técnicas têm sido empregadas para subtipagem de *Salmonella*. A sorotipagem tradicional é baseada no esquema de White-Kauffmann-Le Minor, onde identificam-se os antígenos bacterianos através de reações de aglutinação com soro específico (GRIMONT; WEILL, 2007). Esta técnica é amplamente utilizada, porém possui algumas desvantagens, como ser laboriosa e principalmente por não permitir inferir relações filogenéticas necessárias para rastreamento de surtos ou contaminações (RANIERI et al., 2013).

Subtipagem genética como por exemplo *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based PCR* (rep-PCR), Ribotipagem e *Multilocus Sequence Typing* (MLST) podem ser utilizados para identificação dos sorovares de *Salmonella* (RANIERI et al., 2013).

Atualmente o PFGE é considerado como técnica padrão ouro para investigação de surtos e estudos epidemiológicos de *Salmonella*. A metodologia é capaz de criar *fingerprints* do DNA bacteriano, ou seja, como se fossem impressões digitais específicas de cada cepa podendo assim distinguir e agrupar geneticamente cepas de uma mesma bactéria (CDC, 2013).

A análise de PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) é uma metodologia bem estabelecida para a análise de grandes fragmentos de DNA, gerados pela digestão do DNA genômico por endonucleases (MURASE et al., 1995).

A técnica permite separação de grandes fragmentos de DNA (~600 kb) ao passo que a eletroforese utiliza mais de um campo elétrico geralmente em ângulo de 120° e de forma alternada por pulsos, o que resulta na separação de diferentes tamanhos de fragmentos de DNA (MAGALHÃES et al., 2005; SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

A análise de isolados oriundos de áreas próximas, ou correlatas, pode indicar a propagação de clones idênticos de *Salmonella* ao longo da cadeia produtiva (PANG et al., 2007). A identificação de um mesmo clone no início e fim do processo (produto final), pode indicar persistência da linhagem. Clones diferentes podem ser indicação de contaminação cruzada ao longo da linha de processamento. A comparação entre linhagens de *Salmonella* isoladas a partir de áreas e período de tempo diferentes podem responder essas questões.

Apesar da precisa identificação de clones, o método possui a desvantagem de ser laborioso, e até uma semana pode ser necessária para que os resultados estejam disponíveis (LACONCHA et al., 2000).

Referências

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 3ª ed. [s.l.] Guildford, 2008.
- AGRIC. **Cultivo da soja no Brasil**. Disponível em: <http://www.agric.com.br/producoes/cultivo_da_soja.html>.
- ALBUQUERQUE, R.; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Study of occurrence of salmonelas in feedstuffs, feeds and dust swabs in feed mill. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, 1999.
- ALJARALLAH, K. M.; ADAMS, M. R. Mechanisms of heat inactivation in Salmonella serotype Typhimurium as affected by low water activity at different temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 153–160, 2007.
- ANONYMOUS. **Annual Report on Zoonoses in Denmark 2013** National Food Institute, Technical University of Denmark. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.google.com/search?source=ig&hl=en&rlz=1G1TSAUCENAU379&=&q=Annual+report+on+zoonoses+in+denmark+1998&aq=f&aql=&oq=&gs_rfai=>>.

ANTOLA, A.-S. **Salmonella enterica in Swine Feed Ingredients: A Review and Implications for Control Policies**. [s.l.] University of Helsinki, 2013.

ARCHER, J. et al. Heat Resistance of *Salmonella weltevreden* in Low-Moisture Environments. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 8, p. 969–973, 1998.

AVILES, B. et al. Survival of *Salmonella enterica* Serotype Tennessee during Simulated Gastric Passage Is Improved by Low Water Activity and High Fat Content. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 2, p. 333–337, 2013.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 199–218, 1995.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A.; MCCLURE, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiol**, v. 10, p. 43–59, 1993.

BARRILE, J. C.; CONE, J. F. Effect of added moisture on the heat resistance of *Salmonella anatum* in milk chocolate. **Applied microbiology**, v. 19, n. 1, p. 177–178, 1970.

BEHRAVESH, C. B. et al. Human *Salmonella* infections linked to contaminated dry dog and cat food, 2006-2008. **Pediatrics**, v. 126, n. 3, p. 477–483, 2010.

BEUCHAT, L. R.; DOYLE, M. P. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 3^a ed. [s.l.] ASM, 2007.

BEUCHAT, L. R.; MANN, D. A. Survival of *Salmonella* in Cookie and Cracker Sandwiches Containing Inoculated , Low – Water Activity Fillings. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 10, p. 1828–1834, 2015.

BIGELOW, W. D.; ESTY, J. R. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 602–617, 1920.

BLESSINGTON, T.; MITCHAM, E. J.; HARRIS, L. J. Survival of *Salmonella enterica* , *Escherichia coli* O157 : H7 , and *Listeria monocytogenes* on Inoculated Walnut Kernels during Storage. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 245–254, 2012.

BOARINI, L.; BERALDO-MASSOLI, M. C.; CASAGRANDE, M. F. Identification of *Clostridium perfringens* and *Salmonella* spp . in Swine Through PCR. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 55, n. December, p. 1–7, 2015.

BOQVIST, S. et al. *Salmonella* isolated from animals and feed production in Sweden between 1993 and 1997. **Acta Vet. Scand.**, v. 44, n. 3, p. 181–197., 2003.

BRASIL. **Regulamento Técnico da Soja, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade intrínseca e extrínseca, a amostragem e a marcação ou rotulagem**. [s.l.: s.n.].

BRASIL. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA**. [s.l.: s.n.].

BRASIL. **Doenças Transmitidas por Alimentos**.

BUCHANAN, R. L. Developing and distributing user-friendly application software.

Journal of Industrial Microbiology, v. 12, n. 3–5, p. 251–255, 1993a.

BUCHANAN, R. L. Predictive food microbiology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, n. January, 1993b.

BURNS, A. M. et al. **The Link Between Feed and Salmonella**. Pig Farmers' Conference 2012. **Anais...**2014

CANÇADO, R. A. **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E MICOTOXICOLÓGICA DE GRÃOS DE MILHO (Zea mays Linné) E SOJA (Glycine max. (Linné) Merrill) PROVENIENTES DE CULTIVO CONVENCIONAL DAS SEMENTES NATURAIS E GENETICAMENTE MODIFICADAS**. [s.l: s.n.].

CARVALHO, E. R. et al. Performance of soybean [Glycine max (L.) Merrill] cultivars in the summer cropping in the south of Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 892–899, 2010.

CARVALHO, V. G. **DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA PARA A DOSAGEM DE MICRONUTRIENTES PARA RAÇÃO ANIMAL**. [s.l: s.n.].

CDC. **Multistate Outbreak of Salmonella Serotype Agona Infections Linked to Toasted Oats Cereal**. [s.l: s.n.].

CDC. **Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996--2010** Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). [s.l: s.n.].

CDC. **Multistate Outbreak of Human Salmonella Infantis Infections Linked to Dry Dog Food (Final Update)**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/dog-food-05-12/index.html>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

CDC. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157 : H7 , Escherichia coli non - O157 (STEC), Salmonella serotypes , Shigella sonnei and Shigella flexneri. 2013.

CDC. **Salmonella Montevideo and Salmonella Senftenberg Infections Linked to Wonderful Pistachios**.

CDC. **List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations**.

CHUNG, K. C.; GOEPFERT, J. M. Growth of Salmonella at low pH. **Journal of Food Science**, v. 35, p. 326–328, 1970.

COELI, C. C. DE M. **Análise da Demanda por Transporte Ferroviário: O Caso do Transporte de Grãos e Farelo de Soja na Ferronorte**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

CONAB. **Acompanhamento da Safra brasileira de grãos - Terceiro levantamento - Dezembro de 2016**. [s.l: s.n.].

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: graos. Quarto levantamento**. Brasília: [s.n.].

CVE/DDTHA. **DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ÁGUA E ALIMENTOS SALMONELLA ENTERITIDIS/SALMONELOSES**. Informe NET DTA. [s.l: s.n.].

DA SILVA, F. F. P. et al. Occurrence of Salmonella spp. and generic Escherichia coli on beef carcasses sampled at a brazilian slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 17–23, 2014.

DAVIES, R. H.; WALES, A. D. Salmonella contamination of cereal ingredients for animal feeds. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3–4, p. 543–549, 2013.

DEAGRO. Informativo DEAGRO/FIESP. Safra Mundial de Soja 2014/15 – Abril de 2015 - 12º Levantamento do USDA. [s.l: s.n.].

DENG, X.; LI, Z.; ZHANG, W. Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 311–315, 2012.

DEVLIEGHERE, F. et al. Predictive Microbiology. In: COSTA, R.; KRISTBERGSSON, K. (Eds.). . **Predictive Modeling and Risk Assessment**. [s.l.] Springer Science+Business Media, 2009. p. 101–119.

DODD, C. E. R.; RICHARDS, P. J.; ALDSWORTH, T. G. Suicide through stress: A bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 46–50, 2007.

DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. L. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 4ª ed. [s.l.] ASM, 2013.

EFSA. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals Scientific Opinion of the Panel on Biological HazardsThe EFSA Journal. [s.l.: s.n.]. Disponível em:
http://www.elika.net/datos/articulos/Archivo297/BIOHAZ_PiensosSalmonella08.pdf.

EFSA. Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 Part B: factors associated with Salmonella pen positivityEFSA Journal. [s.l.: s.n.].

FARAKOS, S. M. S.; FRANK, J. F.; SCHAFFNER, D. W. International Journal of Food Microbiology Modeling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of Salmonella in low-moisture foods. **International Journal Food Microbiology**, v. 166, p. 280–293, 2013.

FARAKOS, S. M. S.; HICKS, J. W.; FRANK, J. F. Temperature Resistance of Salmonella in Low – Water Activity Whey Protein Powder as Influenced by Salt Content. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 4, p. 631–634, 2014.

FARAKOS, S. M. S.; SCHAFFNER, D. W.; FRANK, J. F. Predicting Survival of Salmonella in Low – Water Activity Foods: An Analysis of Literature Data t. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 9, p. 1448–1461, 2014.

FDA. Approximate pH of Foods and Food Products. p. 1–13, 2007.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 5ª ed. [s.l.] Manole, 2015.

GOEPFERT, J. M.; BIGGIE, R. A. Heat Resistance of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella senftenberg* 775W in Milk Chocolate. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 1939–1940, 1968.

GRASSO, E. Thermal Resistance of Salmonella and E . coli in Low Water Activity Foods Low Water Activity Products. 2014.

GRIMONT, P.; WEILL, F. **Antigenic Formulae of the Salmonella serovars**. Paris: [s.n.].

GRUZDEV, N.; PINTO, R.; SELA, S. Effect of desiccation on tolerance of Salmonella enterica to multiple stresses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1667–1673, 2011.

GUIMARÃES JÚNIOR, M. A. P. **Aplicação de HACCP e técnicas estatísticas em uma fábrica de farelo de soja**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

HÄGGBLOM PER. **Control of feed in Sweden Salmonella in the feed chain, Biotracer**. Uppsala: [s.n.].

HALD, T. et al. Human Health Impact of Salmonella Contamination in Imported Soybean Products: A Semiquantitative Risk Assessment. **Foodborne pathogens and disease**, v. 3, n. 4, p. 422–431, 2006.

HAMMACK, T. Salmonella species. In: LAMPEL, K.; AL-KHALDI, S.; CAHILL, S. (Eds.). **Bad Bug Book**. 2nd. ed. [s.l: s.n.]. p. 9–12.

HE, Y. et al. Increased Water Activity Reduces the Thermal Resistance of Salmonella enterica in Peanut Butter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4763–4767, 2013.

HOKUNAN, H. et al. Survival Kinetics of Salmonella enterica and Enterohemorrhagic Escherichia coli on a Plastic Surface at Low Relative Humidity and on Low – Water Activity Foods. **Journal of Food Protection**, v. 79, p. 1680–1692, 2016.

JACKSON, B. R. et al. Outbreak-associated Salmonella enterica Serotypes and Food Commodities, United States, 1998–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, p. 1239–1244, ago. 2013.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7th. ed. [s.l.] Springer, 2005.

JONES, F. T. A review of practical Salmonella control measures in animal feed. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 1, p. 102–113, 2011.

JUNEJA, V. J.; SOFOS, J. N. **Pathogens and Toxins in Food: Challenges and Interventions**. Washington: ASM, 2009.

JUNG, Y. S.; BEUCHAT, L. R. Survival of multidrug-resistant Salmonella typhimurium DT104 in egg powders as affected by water activity and temperature. **International Journal Food Microbiology**, v. 49, p. 1–8, 1999.

JUVEN, B. J. et al. Survival of Salmonella in Dry Food and Feed. **Journal of Food Protection**, v. 47, p. 445–448, 1984.

KIRK, M. D. et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1–21, 2015.

KOTZEKIDOU, P. Microbial Stability and Fate of Salmonella Enteritidis in Halva, a Low-Moisture Confection. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 181–185, 1998.

KOUTSOUMANIS, K. P.; ASPRIDOU, Z. Individual cell heterogeneity in Predictive Food Microbiology: Challenges in predicting a “noisy” world. **International Journal of Food Microbiology**, 2016.

KOUTSOUMANIS, K. P.; LIANOU, A. Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2294–2301, 2013.

KRAPF, T.; GANTENBEIN-DEMARCHI, C. Thermal inactivation of Salmonella spp. during conching. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 720–723, 2010.

LACONCHA, I. et al. Genotypic characterisation by PFGE of Salmonella enterica serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 155–165, 2000.

LARA, M. A. M. **Processo de Produção de Ração - Moagem (Parte 1)**.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 310–321, 2013.

LOMBARD, J. E. et al. Comparison of individual, pooled, and composite fecal sampling methods for detection of Salmonella on U.S. dairy operations. **Journal of food protection**, v. 75, n. 9, p. 1562–71, 2012.

LYNCH, M. F.; TAUXE, R. V.; HEDBERG, C. W. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 3, p. 307–315, 2009.

MA, L. I. et al. Thermal Inactivation of Salmonella in Peanut Butter. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 8, p. 1596–1601, 2009.

MACKEY, B. M.; DERRICK, C. M. Changes in the heat resistance of Salmonella typhimurium during heating at rising temperatures. **Letters in Applied Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 13–16, 1987.

MAFART, P. et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 107–113, 2002.

MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155–161, 2005.

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. **Tecnologia para Produção de Óleo de Soja: Descrição das Etapas, Equipamentos, Produtos e Subprodutos**. [s.l: s.n.].

MCDONALD, K.; SUN, D.-W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, n. 1–2, p. 1–27,

1999.

MCMEEKIN, T. A. et al. **Predictive Microbiology : Theory and Application**. Taunton: Research Studies Press, 1993.

MCMEEKIN, T. A. et al. Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 2–3, p. 395–407, 2002.

MEDEIROS, M. A. N. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 30, n. 6, p. 555–560, 2011.

MILNER, K. C.; SHAFFER, M. F. Bacteriologic Studies of Experimental Salmonella Infections in Chicks. **Journal of Infectious Diseases**, v. 90, n. 1, p. 81–96, 1952.

MISSAO, M. R. Soybean : Origin , Classification , Use and an Including Vision of Market. **Revsita de Ciencias Empresariais**, v. 3, p. 7–15, 2006.

MUÑOZ-CUEVAS, M.; METRIS, A.; BARANYI, J. Predictive modelling of Salmonella: From cell cycle measurements to e-models. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 852–862, 2012.

MURASE, T. et al. Evaluation of DNA Fingerprinting Epidemiologic Tool for Salmonella by PFGE as an Infections. **Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 9, p. 673–676, 1995.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 41–51, 2000.

NASCIMENTO, M. S. et al. Inactivation of Salmonella during cocoa roasting and chocolate conching. **International Journal Food Microbiology**, v. 159, p. 225–229, 2012.

NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N. **Características da soja**.

ORLOVSKIS, Z. et al. Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. **Current Opinion in Insect Science**, v. 9, p. 16–23, 2015.

PANG, J. C. et al. A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests a major world-wide clone of Salmonella enterica serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 305–312, 2007.

PARDI, M. C. **Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação**. [s.l.] Universidade Federal Fluminense. EDUFF - Editora Universitária, 2001.

PELEG, M.; COLE, M. B. Reinterpretation of microbial survival curves. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 38, n. 5, p. 353–380, 1998.

PELLEGRINI, D. C. P. **Avaliação dos pontos de contaminação por Salmonella sp. e coliformes totais durante o preparo de dietas para suínos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

PELLEGRINI, D. DA C. P. et al. Distribution of Salmonella clonal groups in four Brazilian feed mills. **Food Control**, v. 47, p. 672–678, 2015.

PETKAR, A. et al. Survival of Salmonella in Organic and Conventional Broiler Feed as Affected by Temperature and Water Activity. **Agriculture, Food and Analytical Bacteriology**, v. 1, p. 175–185, 2011.

PIPOLO, A. E. et al. **Teores de óleo e proteína em soja: fatores envolvidos e qualidade para a indústria**. [s.l.: s.n.].

PUKASIEWICZ, S. R. M.; OLIVEIRA, I. L. DE; PILATTI, L. A. **Estudo de caso: gerenciamento de resíduos sólidos industriais em uma indústria processadora de soja**. XI Simpósio de Engenharia de Produção. **Anais...Bauru**: 2004

RACHON, G.; PEÑALOZA, W.; GIBBS, P. A. International Journal of Food Microbiology Inactivation of Salmonella , Listeria monocytogenes and Enterococcus faecium NRRL B-2354 in a selection of low moisture foods. **International Journal Food Microbiology**, v. 231, p. 16–25, 2016.

RANIERI, M. L. et al. Comparison of typing methods with a new procedure based on sequence characterization for Salmonella serovar prediction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1786–1797, 2013.

RAY, B.; BHUNIA, A. **Fundamental Food Microbiology**. [s.l.] CRC Press, 2013.

ROBERTS, T. A.; JARVIS, B. Predictive modelling of food safety with particular reference to Clostridium botulinum in model cured meat systems. In: ROBERTS, T. A.; SKINNER, F. A. (Eds.). **Food Microbiology: advances and prospects**. New York: Academic Press, 1983. p. 85–95.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International Journal Food Microbiology**, v. 23, p. 241–264, 1994.

RÜCKERT, D. A. S. VON et al. Pontos críticos de controle de Salmonella spp. no abate de frangos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 61, n. 2, p. 326–330, 2009.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. **Cell**, v. 37, p. 67–75, 1984.

SHAH, J. **Stress Response And Pathogenesis of Salmonella enterica serovar Typhimurium**. [s.l.: s.n.].

SIRSAT, S. A. et al. Effect of sublethal heat stress on Salmonella Typhimurium virulence. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 110, p. 813–822, 2011.

SOARES, C. M. et al. **Salmonella spp detection in soybean meal samples from crushing plants in Brazil**. The EC Review Meeting and 4th General Meeting. **Anais...Copenhagen**: 2010

SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of Salmonella enterica to environmental stresses. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 455–481, 2012.

TAMMINGA, S. K. et al. Survival of Salmonella east bourne and Salmonella typhimurium in chocolate. **Epidemiology and Infection**, v. 76, p. 41–47, 1975.

TORLAK, E.; SERT, D.; SERIN, P. Fate of Salmonella during sesame seeds roasting and storage of tahini. **International Journal Food Microbiology**, v. 163, p. 214–217, 2013.

TORRES, G. J. et al. The prevalence of Salmonella enterica in Spanish feed mills and potential feed-related risk factors for contamination. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, n. 2–3, p. 81–87, 2011.

USDA. **Cost of foodborne illness estimates for Salmonella (nontyphoidal)**. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses.aspx#48498>>.

VANCAUWENBERGE, J. E.; BOTHAST, R. J.; KWOLEK, W. F. Thermal Inactivation of Eight Salmonella Serotypes on Dry Corn Flour. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 688–691, 1981.

VILLA-ROJAS, R. et al. Thermal Inactivation of Salmonella Enteritidis PT 30 in Almond Kernels as Influenced by Water Activity. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 26–32, 2013.

WALLS, I.; SCOTT, V. . N. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. **International Journal Food Microbiology**, v. 36, p. 97–102, 1997.

WALTERS, M. J. The Travels of Antibiotic Resistance: Salmonella DT104. In: WALTERS, M. J. (Ed.). . **Seven Modern Plagues: and How We Are Causing Them**. 1. ed. Washington: Island Press, 2014. p. 53–82.

WEIBULL, W. A Statistical Distribution Function of Wide Applicability By. **Journal of Applied Mechanics**, v. 103, n. 51, p. 293–297, 1951.

WHO. Background document: The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever. **Communicable Disease Surveillance and Response Vaccines and Biologicals**, p. 2–48, 2003.

WIERUP, M.; HÄGGBLOM, P. An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of Salmonella contamination in pig production. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 15, 2010.

WIERUP, M.; KRISTOFFERSEN, T. Prevention of Salmonella contamination of finished soybean meal used for animal feed by a Norwegian production plant despite frequent Salmonella contamination of raw soy beans, 1994-2012. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, p. 41, 2014.

WILLIS, S. **The use of Soybean Meal and Full Fat Soybean Meal by the Animal Feed Industry**. 12th Australian Soybean Conference. **Anais...Australia**: 2003

YANG, S. et al. Investigations into Salmonella contamination in feed production chain in Karst rural areas of China. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–8, 2016.

CAPÍTULO 2: INCIDÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE *SALMONELLA* SPP. EM AMOSTRAS DE SOJA E DERIVADOS NO BRASIL.

Incidência, caracterização e sobrevivência de *Salmonella* spp. em amostras de soja e derivados.

Monyca Dias Rocha¹, Anderson de Souza Sant'Ana¹

¹ Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Campinas, Brasil.

**Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista
“Applied and Environmental Microbiology”**

Introdução

Salmonella é um dos principais agentes causadores de DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos) no mundo. No Brasil, esta bactéria é responsável por 7,5% dos casos elucidados, sendo o principal agente etiológico envolvido nos surtos (BRASIL, 2016). Apesar de as enfermidades causadas não serem frequentemente fatais, sua presença pode causar massivos *recalls* de lotes inteiros, ou até mesmo impedir a entrada de produtos em mercados consumidores estrangeiros (CDC, 2016; EUROPEAN COMMISSION, 2016). O controle passa então, além de ser questão de saúde pública, questão econômica.

O Brasil tem importante destaque no cenário mundial dos agronegócios, especialmente de soja e seus derivados, sendo o maior exportador do mundo. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a soja é a principal *commodity* brasileira, com exportação aproximada de 58 milhões de toneladas para a safra 2016/2017 (CONAB, 2016).

O farelo de soja é a maior fonte de proteína utilizada em ração para gado, suíno, aves bem como peixes e *pets* (WILLIS, 2003). A importância da qualidade microbiológica da ração utilizada para alimentar os animais é primordial, pois os mesmos sorotipos de *Salmonella* isolados de infecções clínicas tem sido frequentemente isolados de rações animais (CDC, 2012; WIERUP; HÄGGBLUM, 2010).

A identificação dos pontos passíveis de contaminação é uma maneira eficaz de se combater a presença do patógeno nas linhas de produção (CASTRO-IBÁÑEZ et al., 2015; DELHALLE et al., 2009). A amostragem em diferentes etapas do processo produtivo, desde a obtenção da matéria prima até o transporte e armazenagem do produto final é vital para o controle microbiológico (JACXSENS et al., 2015; MANZINI; ACCORSI, 2013).

Além do enfoque clássico, com análises baseadas em microbiologia tradicional, metodologias empregando análises moleculares são cada vez mais comuns para a rastreabilidade de patógenos (MALORNY et al., 2003; SCHELIN et al., 2014). Estas ferramentas ajudam a entender a epidemiologia microbiana, nos dizendo se a presença de determinada cepa está persistindo no ambiente

ou é originária de um clone diferente (CHIOU et al., 2015; COSSI et al., 2014; PRUNIĆ et al., 2016). Com essas informações em mãos, ensaios baseados em microbiologia preditiva podem nos fornecer dados de como essas populações irão se comportar em substratos específicos, garantindo produtos seguros do ponto de vista microbiológico (ZOU et al., 2010).

Diversas pesquisas apontaram ingredientes presentes em rações animais como os responsáveis pela contaminação por *Salmonella* (DAVIES; WALES, 2013; DAVIS et al., 2003; WIERUP; HÄGGBLÖM, 2010). Entretanto, para nosso conhecimento, nenhuma pesquisa buscou avaliar, até o presente momento, a incidência de *Salmonella* em grãos de soja e ao longo da cadeia produtiva em um mesmo estudo.

Assim, esta pesquisa teve como objetivos isolar e identificar a presença de *Salmonella* em diferentes etapas da cadeia produtiva durante o beneficiamento de soja em 5 diferentes indústrias brasileiras. Além disso, este estudo propôs averiguar se a bactéria é persistente no ambiente ou advinda de contaminação cruzada. Por fim, pensando nas condições de estocagem dos grãos de soja destinados à exportação, ensaios de contagem de sobreviventes em diferentes temperaturas foram conduzidos.

Os resultados obtidos neste estudo pioneiro são de fundamental importância para o setor de agronegócios, uma vez que a identificação de pontos de contaminação, assim como o entendimento da ecologia e comportamento de *Salmonella* em *commodities*, ajudam a diminuir as perdas de produção devidas a este patógeno.

Material e métodos

Amostragem. Durante 8 meses (março/2015 a outubro/2015), foram coletadas amostras a partir de 5 plantas de processamento de soja (nomeadas de “A” a “E”), além de amostras oriundas do porto e armazém de estocagem para exportação. No total foram analisadas 713 amostras (n=713), sendo divididas em: grãos de soja oriundos do porto (n=179), etapas de beneficiamento dos grãos de soja (n=328), amostras ambientais compostas por poeira e resíduos do ambiente (n=148) e produto final (farelo de soja) para exportação (n=58).

A partir dos fluxogramas de processamento fornecidos, foram definidas as etapas a serem amostradas no interior das indústrias, levando em

consideração condições prováveis de contaminação, recontaminação e eliminação do perigo. A Figura 1 apresenta, de forma esquematizada, o fluxograma de produção adotado para amostragem (Fig. 1).

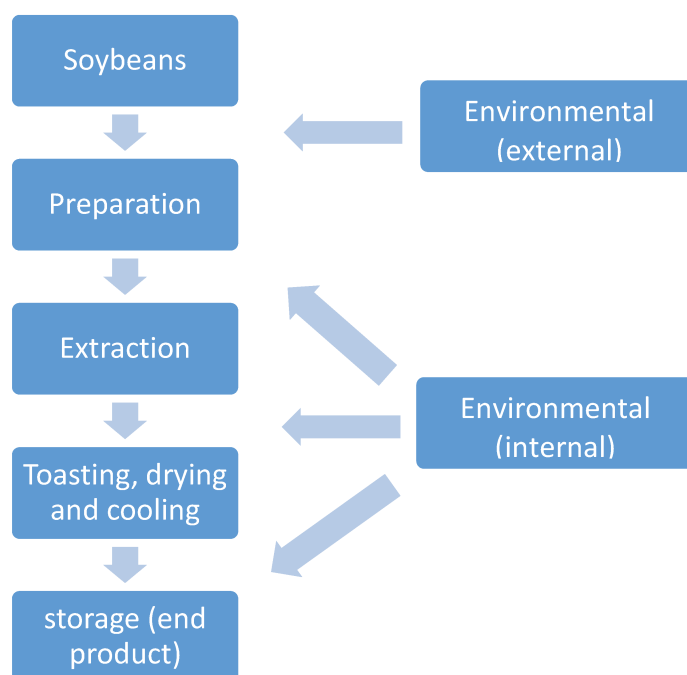


Figura 1. Fluxograma de produção de farelo de soja.

As etapas presentes no fluxograma consistem no processo de beneficiamento e amostras ambientais, como descrito na Tabela 1. O resíduo do processo foi analisado com finalidade de averiguar se *Salmonella* estava presente no ambiente, significando uma fonte de contaminação. A esta etapa deu-se o nome de amostras ambientais.

Tabela 1: Descrição das amostras coletadas de etapas do processo de beneficiamento.

Macro divisão	Etapa resumida	Amostras compreendidas
Etapas de Beneficiamento dos grãos de soja	Grãos	Classificação, Descarga em moegas, Silo Pulmão, Alimentação.
	Preparação	Pesagem, Moagem, Condicionamento, Expansão, Resfriamento da expansão, Laminador.
	Extração	Extração, Farelo de soja com solvente - farelo branco
	Tostagem, secagem e resfriamento	Desolventizador tostador, Secagem, Resfriamento, Moinho.
	Estocagem	Estocagem do farelo de soja
Amostras ambientais de pó e resíduos do processamento de soja	Ambientais	Área externa (pé do elevador de soja) e área interna (sistema de aspiração, tulas de carregamento, rastro da pá carregadeira no interior do armazém de farelo e chão da área de carregamento)
Amostras proveniente do porto para exportação	Grãos de soja Exportação (GSE)	Grãos de soja para exportação oriundos do porto
	Produto final Exportação (PFE)	Farelo de soja para exportação oriundos do porto

Deteção e isolamento de *Salmonella* spp. As amostras foram coletadas em sacos plásticos e enviadas para o Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos (LMQA) do Departamento de Ciência de Alimentos da FEA/UNICAMP. A deteção de *Salmonella* spp foi realizada de acordo com a metodologia ISO 6579 com modificações (ANONYMOUS, 2002). As amostras de 25 g foram dispostas em bolsas estéreis e acrescidos 225 mL de água peptonada tamponada (BPW, Merck, Darmstadt, Germany), seguido de homogeneização manual por 2 minutos. Estas foram incubadas a 37°C/18±2h, seguindo-se enriquecimento seletivo em caldo Rappaport Vassiliadis peptona de soja (RVS, Merck, Darmstadt, Germany) (41,5±1°C/24±3hs) e caldo Muller – Kauffman Tetracionato enriquecido com novobiocina (MKTTn, Oxoid, Basingstoke, UK) (37°C/24±3hs). Após a incubação, ambos os caldos foram semeados em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Oxoid, Basingstoke, UK) e Ágar Verde Brilhante Manitol Lisina Cristal de Violeta (MLCB, Oxoid, Basingstoke, UK) e incubados a

37°C/24±3hs. De 3 a 5 colônias presuntivas em placas de XLD e/ou MLCB apresentando características de centro preto com zona levemente transparente de cor avermelhada e colônias com centro negro com zona levemente transparente de coloração lilás, respectivamente foram transferidas para placas de ágar nutriente (NA, Merck, Darmstadt, Germany), incubadas a 37°C/24±3hs e então submetidas ao teste de reação de aglutinação usando soro polivalente anti-*Salmonella* (Probac, São Paulo, Brasil).

Para a amostragem de produto final, a metodologia foi adaptada da análise de micotoxinas (FAO, 1995), onde a homogeneização é enfatizada de modo a aumentar a probabilidade de isolamento de *Salmonella* spp. A unidade amostral foi composta por 15 sub-amostras de 25g, totalizando 375 g/amostra/produto final, como descrito no Bacteriological Analytical Manual (ANDREWS; HAMMACK, 2003), uma vez que pressupõe-se que esta bactéria está em pequena concentração no alimento. Foi utilizada a mesma proporção (x15) para caldos de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo. Cada amostra foi semeada em 3 placas de XLD e MLCB. A confirmação foi realizada em soro anti-*Salmonella*, como descrito acima.

Análise de RT-PCR dos isolados de *Salmonella* spp. Todas as cepas isoladas na etapa de isolamento foram submetidas à técnica de PCR Real Time utilizando os *primers* ST 11 (AGC CAA CCA TTG CTA AAT TGG CGC A) e ST 15 (GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG) selecionados a partir do fragmento JEO402-1, altamente específico para espécies de *Salmonella* visando amplificação de uma região de 429pb igualmente específica desse micro-organismo (AABO et al., 1993; SANT'ANA et al., 2011). Como cepa controle positivo foi utilizada cultura pura de *Salmonella* Senftenberg 775W (cepa S87 cedida pela Fundação Oswaldo Cruz), ao passo que *E. coli* foi utilizada como controle negativo. O protocolo utilizado foi adaptado de Crucello e colaboradores (2015). As reações foram realizadas em placas de 384 poços, contendo em cada poço 2.5 µL de SYBR Green Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.0 µL dos *primers forward* e *reverse*, 1.0 µL de DNA bacteriano e 0.5 µL de água deionizada, totalizando 5.00 µL. RT-PCR foi conduzido no CFX384 Touch Real-Time PCR DetectionSystem (BioRad). Os parâmetros utilizados foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a

95°C e 60 segundos a 60°C. Todas as amplificações foram conduzidas em duplicata. Os resultados foram expressos como presença / ausência de *Salmonella* / amostra, sendo calculada a incidência por local amostrado.

Findada a triagem das colônias em soro polivalente e PCR, aproximadamente 40% dos resultados mostraram-se discordantes entre as duas metodologias. Optou-se, portanto, em realizar novos testes sorológicos com o DIFCO *Salmonella* O antiserum Poly A-I & Vi (DIFCO, Laboratories Inc., Franklin Lakes, NJ, USA)

Caracterização fenotípica e genotípica das cepas isoladas. As cepas de *Salmonella* spp. foram enviadas à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro) para sorotipagem baseada em suas estruturas antigênicas (GRIMONT; WEILL, 2007). Os sorotipos Mbandaka e Cubana foram os mais prevalentes e cepas isoladas de indústrias, locais de amostragem e data de coleta diferentes foram selecionados para análise genética por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) para obter informações relacionadas a ancestralidade das cepas. Devido à alta prevalência de *Salmonella* Senftenberg em grãos de soja e derivados associada a sua conhecida resistência térmica e à desidratação (BOQVIST et al., 2003; HALD et al., 2006, 2012; LI et al., 2012; PEDERSEN; OLSEN; BISGAARD, 2008; PELLEGRINI et al., 2015; SOARES et al., 2010; TORRES et al., 2011; WIERUP; HÄGGBLUM, 2010) uma cepa deste sorotipo foi selecionada para análise epidemiológica comparativa com cepas isoladas em outros estados brasileiros.

O PFGE foi realizado de acordo com o protocolo do PulseNet, Estados Unidos (CDC, 2013).

Preparo do inóculo para ensaio de sobrevivência de *Salmonella* Senftenberg em grãos de soja. A cepa utilizada no estudo foi a *Salmonella* Senftenberg 775w (S87) cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, e foi escolhida por se tratar de um dos principais sorotipos isolados em grãos de soja e derivados e por sua alta resistência a condições de estresse. O preparo das suspensões seguiu-se de crescimento em 10 mL de caldo Tryptone Soy Broth (TSB, Oxoid, Basingstoke, UK) incubado a 37°C/24h e repique subsequente em 200 mL de caldo TSB fresco e incubado nas mesmas condições. As culturas

foram centrifugadas a $2810 \times g$ por 10 minutos a 4°C (Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA), o sobrenadante descartado e procedidas 3 lavagens com água peptonada 0,1%. O pellet final foi então ressuspenso em água peptonada 0,1%. A concentração da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (Beckman modelo DU640B) para uma densidade óptica de 0.6 (D.O.₆₃₀), equivalente a 10^8UFC/mL (SANT'ANA et al., 2012). A concentração foi confirmada procedendo contagem em ágar MLCB.

Preparo e contaminação das amostras. Uma porção de 25g de grãos de soja foi analisada previamente para avaliar a contaminação inicial por *Salmonella* spp (controle negativo). Foi realizada a desinfecção do restante dos grãos com hipoclorito de sódio (100 ppm / 10 minutos) a fim de remover a possível microbiota dos grãos (PAUCAR-MENACHO et al., 2010). A secagem foi realizada em estufa a 55°C durante 17 horas (ou até o produto atingir atividade de água abaixo de 0,69). Após esse período, os grãos foram aspergidos com uma suspensão de *Salmonella* almejando uma concentração final de 10^5UFC/g (confirmados por enumeração, N_0). Em seguida à aspersão, os grãos foram mantidos em temperatura ambiente dentro de fluxo laminar durante 15 minutos para completa absorção do inóculo.

Condições de estocagem das amostras contaminadas. Quinze ($n=15$) pacotes contendo individualmente 10g de grão de soja contaminados foram incubados a 20, 30 e 37°C , por 60, 22 e 4 dias respectivamente. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

Enumeração de *Salmonella*. As análises para quantificação de *Salmonella* Senftenberg foram realizadas utilizando 10g de grãos de soja contaminados acrescidos de 90ml de água peptonada 0,1% seguindo de diluição seriada e foi realizado o plaqueamento em superfície em ágar MLCB. As placas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C}/24 \pm 3\text{hs}$. Decorrido este tempo foi realizada a contagem das colônias características.

Modelagem da sobrevivência de *Salmonella* em grãos de soja. Os dados de sobrevivência de *Salmonella*, para cada temperatura de estocagem,

foram plotados em função do tempo. As curvas obtidas foram modeladas através do *Add-in* do Excel GlnaFiT®. De acordo com a cinética observada pôde se ajustar os dados utilizando o modelo de Weibull (equação 1).

$$(1) \log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p$$

Onde, N é $\log_{10}$ UFC/g; t é tempo (dias), p é parâmetro de curvatura (adimensional) e delta é tempo para a primeira redução decimal (dias) (MAFART et al., 2002).

Análise dos dados.

Para avaliar as taxas de incidência (amostras positivas / local coletada / indústria coletada), foi realizado o teste Qui-Quadrado, através do procedimento FREQ do SAS (SAS INSTITUTE INC. System for Microsoft Windows, Release 9.4, Cary, NC, USA, 2002-2012), comparando-as pelo teste exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

A análise de correspondência (CA) foi utilizada para obter um mapa bidimensional para observar a relação entre as etapas de processamento e as cepas isoladas em cada etapa. CA é uma técnica descritiva / exploratória destinada a examinar Tabelas de contingência com duas entradas contendo medidas de correspondência entre as linhas e colunas. As variáveis são projetadas no plano fator, proporcionando uma representação visual e simultânea de todos os dados (Santos et al., 2015). Também são construídas elipses de confiança em torno das etapas do processamento que contém 95% dos dados. Se eles são superpostos, as etapas do processamento não são significativamente diferentes considerando a tensão isolada, sendo o tamanho das elipses relacionadas à variabilidade existente em torno das cepas isoladas em cada etapa do processamento (Worch, 2010).

Resultados

Deteção e isolamento a partir de amostras de grãos de soja, produto final (farelo), amostras das etapas do processo de beneficiamento e amostras ambientais. Das 713 amostras analisadas no total, 92 (12,9%) foram positivas para *Salmonella* spp. como mostrado na Tabela 2. As amostras

ambientais tiveram diferença significativa ($Pr > \chi^2 < 0,0001$) em relação aos demais locais amostrados.

Tabela 2. Prevalência de amostras positivas de *Salmonella* spp. por local amostrado.

Local amostrado	Positivas/total
Grãos de soja porto (GSE) ^{c**}	0/179 (0,00%)
Amostras ambientais (pó) ^a	70/148 (47,30%)
Etapas do processo produtivo ^b	8/298 (2,68%)
Produto final (farelo*) ^b	4/30 (13,33%)
Produto final Exportação (PFE) ^b	10/58 (17,24%)
Total	92/713 (12,90%)

*produto final armazenado dentro da indústria

**Letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

A Figura 2 apresenta as porcentagens de amostras positivas para *Salmonella* spp. nas diferentes etapas de beneficiamento do grão de soja, nas diferentes indústrias analisadas.

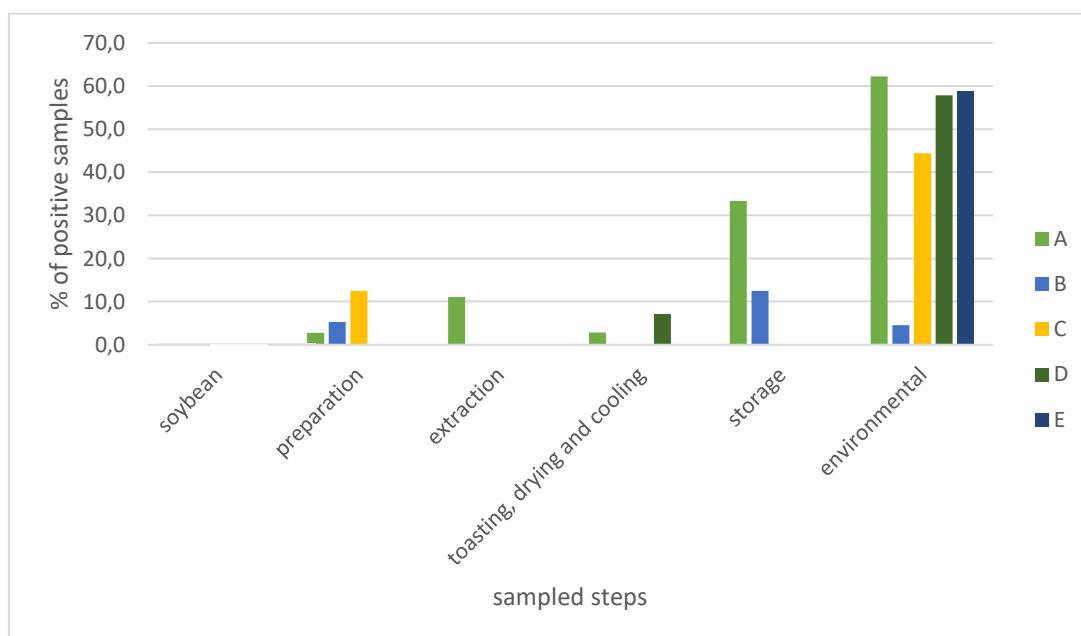


Figura 2. Porcentagem de amostras positivas de *Salmonella* spp., considerando-se diferentes etapas e indústrias.

Deteção e isolamento a partir de amostras de farelo de soja (produto final). Das 88 amostras analisadas, *Salmonella* spp. esteve presente em 15,90% (n=14) das amostras de produto final (farelo de soja). As maiores ocorrências estão nas fábricas A e PFE (Tabela 3).

Tabela 3. Prevalência de *Salmonella* spp. em amostras de produto final (farelo de soja) nas diferentes indústrias e armazéns.

Indústrias	Positivas para <i>Salmonella</i> spp.
A	3/9 (33,33%)
B	1/8 (12,50%)
C	0/9 (0,00%)
D	0/2 (0,00%)
E	0/2 (0,00%)
PFE	10/58 (17,24%)
Total	14/88 (15,90%)

Deteção e isolamento a partir de amostras das etapas do processo de obtenção do farelo de soja. Foram analisadas no total 298 amostras de etapas do processo e 2,68% (n=8) amostras foram positivas. Das cinco indústrias, quatro tiveram pelo menos uma amostra positiva para *Salmonella*. A maior prevalência está na indústria D com 5,12% das amostras contaminadas (Tabela 4).

Tabela 4. Prevalência de *Salmonella* spp. em amostras de processo nas diferentes indústrias.

Indústrias	Positivas para <i>Salmonella</i> spp.
A	3/89 (3,37%)
B	2/90 (2,22%)
C	1/44 (2,27%)
D	2/39 (5,12%)
E	0/36 (0,00%)
Total	8/298 (2,68%)

Deteção e isolamento a partir de amostras de resíduo/pó coletadas no ambiente das indústrias beneficiadoras de soja: Das 148 amostras analisadas, 47,30% (n=70) estavam contaminadas com *Salmonella*

spp, sendo a indústria A o local com maior número de amostras positivas (62,22%) (Tabela 5).

Tabela 5. Prevalência de *Salmonella* spp. em amostras de resíduo de pó nas diferentes indústrias.

Indústrias	Positivas para <i>Salmonella</i> spp./ total analisado
A	28/45 (62,22%)
B	1/22 (4,54%)
C	20/45 (44,44%)
D	11/19 (57,89%)
E	10/17 (58,82%)
Total	70/148 (47,30%)

As etapas ambientais analisadas podem ser subdivididas em 5 pontos. A Figura 3 apresenta a porcentagem de amostras positivas para *Salmonella* spp. por ponto de coleta ambiental nas indústrias analisadas. As etapas tulhas de carregamento e rastro da pá carregadeira no interior do armazém de farelo foram os pontos amostrados com maior contaminação (85,71% e 54,44%, respectivamente) como indicado na Tabela 6.

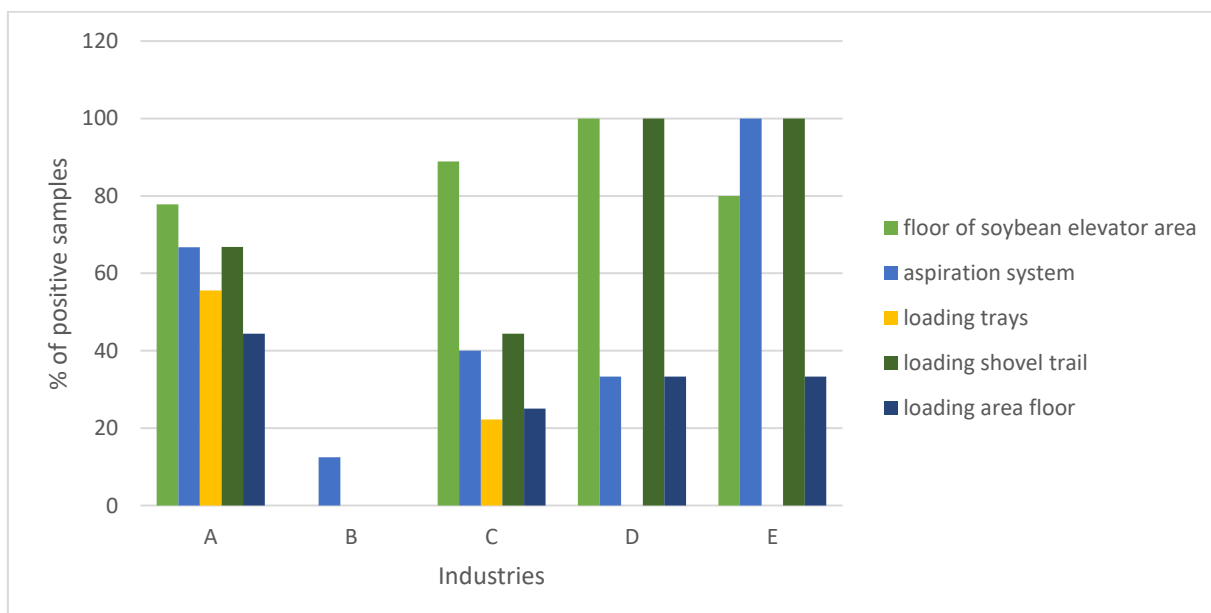


Figura 3. Porcentagem de amostras positivas para *Salmonella* coletadas nas diferentes etapas ambientais.

Tabela 6. Número de amostras positivas para *Salmonella* spp. em amostras ambientais (pó) por fábrica.

Etapa	Indústria					Total
	A	B	C	D	E	
Pé do elevador de soja (área externa)	7/9 (77,78%)	NE	8/9 (88,89%)	5/5 (100,00%)	4/5 (80,00%)	24/28 (85,71%)
Sistema de aspiração (área interna)	6/9 (66,67%)	1/8 (12,50%)	4/10 (40,00%)	1/3 (33,33%)	1/1 (100,00%)	13/31 (41,93%)
Tulhas de carregamento (área interna)	5/9 (55,56%)	NE*	2/9 (22,22%)	0/4 (0,00%)	0/4 (0,00%)	7/26 (26,92%)
Rastro da pá carregadeira no interior do armazém de farelo (área interna)	6/9 (66,67%)	0/7 (0,00%)	4/9 (44,44%)	4/4 (100,00%)	4/4 (100,00%)	18/33 (54,44%)
Chão da área de carregamento (plataforma de carregamento) (área interna)	4/9 (44,44%)	0/7 (0,00%)	2/8 (25,00%)	1/3 (33,33%)	1/3 (33,33%)	8/30 (26,67%)
Total	28/45 (62,22%)	1/22 (4,54%)	20/45 (44,44%)	11/19 (57,89%)	10/17 (58,82%)	70/148 (47,30%)

*amostras não enviadas pela indústria

Diversidade genética dos isolados. Foram obtidos 834 isolados presuntivos de *Salmonella* spp. Esses isolados foram submetidos ao soro polivalente (Probac, São Paulo, Brasil) e a análise genética por PCR para confirmação. Os resultados divergentes entre PCR e soro polivalente, foram submetidos a um segundo soropolivalente (DIFCO, Laboratories Inc., Franklin Lakes, NJ, USA). Os resultados positivos neste soro foram enviados para FIOCRUZ para realização das análises de sorotipagem de *Salmonella* spp. Foram identificados 29 sorotipos diferentes, sendo o mais frequentemente isolado *Salmonella* Mbandaka (Figura 4).

O sorotipo *S. Mbandaka*, além de ser o mais isolado de maneira geral, foi também o mais isolado em todas as etapas do processamento, se consideradas individualmente.

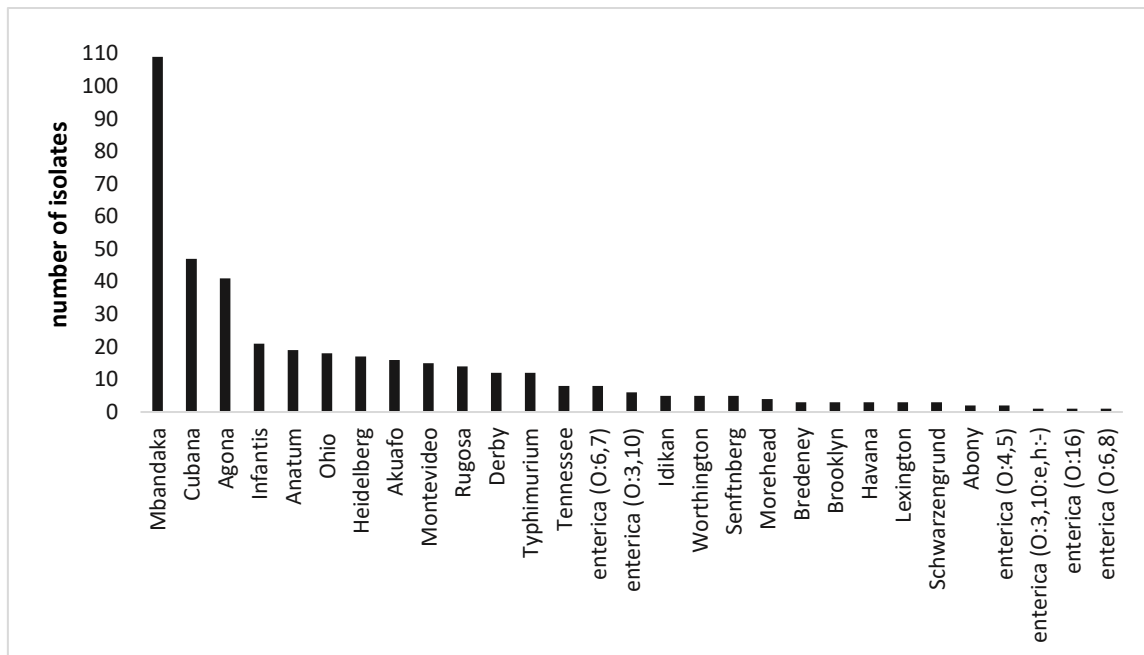


Figura 4: Relação de sorotipos isolados e a quantidade de cepas isoladas de cada sorotipo.

O mapa de calor apresentado na Figura 5 correlaciona o número de isolados de cada sorotipo com a etapa de processamento encontrada nas indústrias.

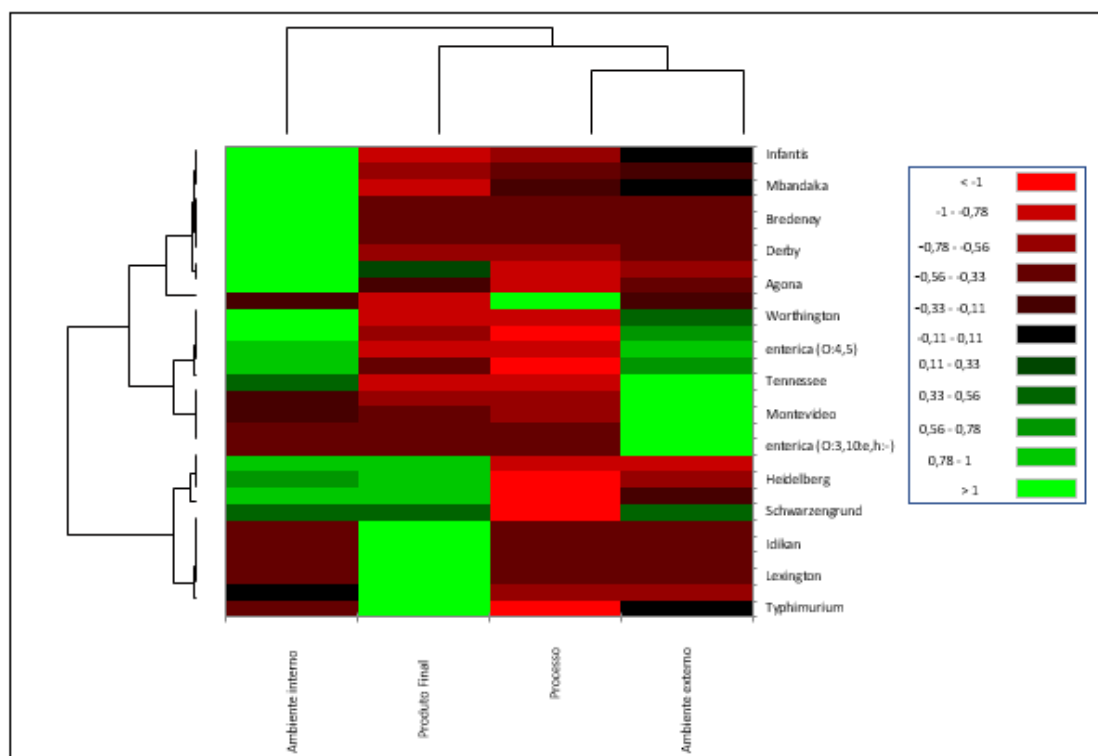


Figura 5. Heat Map relacionado sorotipos isolados por etapa de processamento.

A Figura 6 mostra o mapa bidimensional gerado pelos dados de análise de correspondência juntamente com as elipses de confiança considerando os passos do processamento e o total de cepas de *Salmonella* isoladas. Considerando duas dimensões, observou-se explicação de 78,89% da variância total (dimensão 1: 46,26% e dimensão 2: 32,63%). Os resultados sugerem que a análise de correspondência foi uma ferramenta efetiva para a interpretação dos resultados, ajudando a explicar os dados experimentais usando uma projeção bidimensional. Observou-se que o ambiente interno e externo são confusos e estão associados com a maioria das cepas isoladas enquanto o processo está associado à estirpe Anatum e produto final com a cepa enterica O: (6,7), Typhimurium, Abony, Heidelberg, Senftenberg. As elipses de confiança gerados em torno do processo e do produto final não se sobrepõem e têm grande tamanho, sugerindo que estes passos estão realmente associados a estas cepas de *Salmonella*. Na reserva, o ambiente interno e externo apresentou elipses de confiança com tamanho pequeno, refletindo as cepas de *Salmonella* isoladas nestes passos, não podem ser diferenciadas.

Estes achados são interessantes considerando um ponto de segurança de alimentos e demonstram novas aplicações para a análise de correspondência, juntamente com a metodologia de confiança de elipses, que são normalmente usados em análise sensorial e ciência do consumidor.

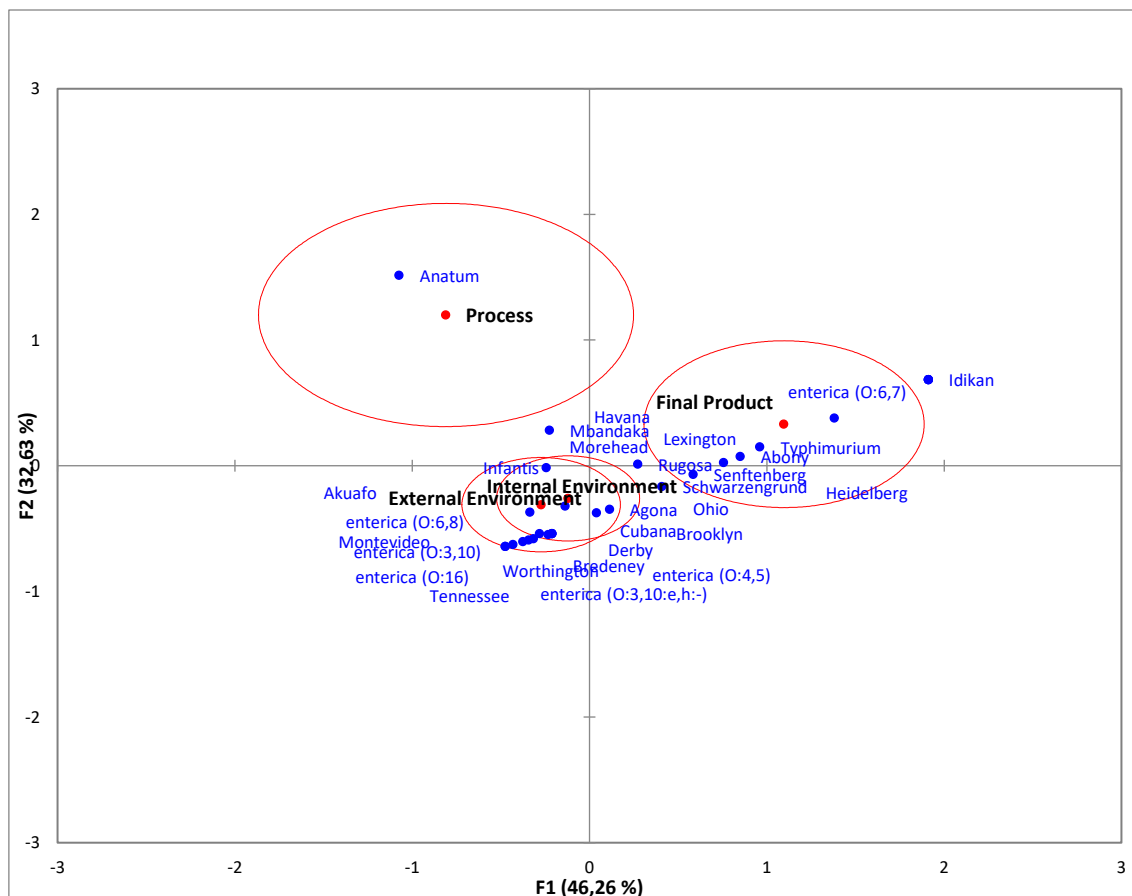


Figura 6. Mapa bidimensional relacionando determinados sorotipos e seus locais de isolamento.

Ao utilizar o método de tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE) com a digestão pela enzima XbaI, sendo os padrões calculados pelo coeficiente de Dice, foi possível verificar que as amostras analisadas isoladas de 4 indústrias diferentes localizadas em cidades ou estados diferentes apresentaram a mesma ancestralidade, pois foi possível agrupá-las em um mesmo *cluster* (grupo clonal) com 84% de similaridade, como mostra a Figura 7.

Ainda na Figura 7, as cepas de Mbandaka 4204/16 e 4228/16 se mostraram clones idênticos, pois apresentaram 100% de similaridade. Essas cepas foram isoladas da indústria D em dias diferentes de coleta e de locais diferentes, sendo uma amostra ambiental e a outra amostra de matéria prima durante o processo de beneficiamento, indicando persistência desta cepa nesta indústria, além de uma possível contaminação cruzada entre ambiente e produto.

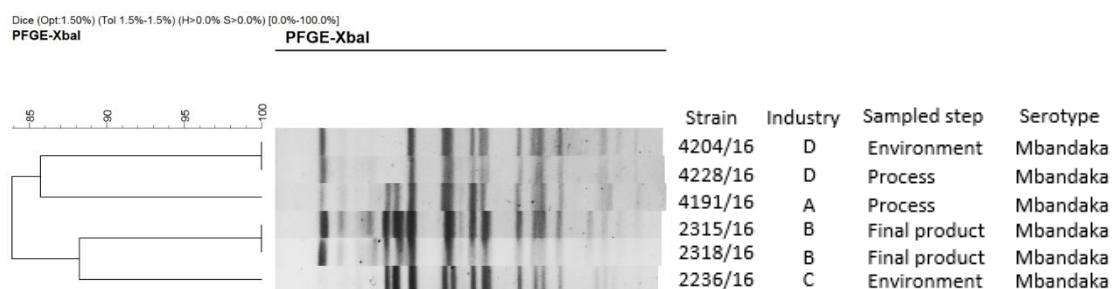


Figura 7: Perfil de digestão pela enzima XbaI e dendrograma de amostras de *Salmonella* Mbandaka isoladas de 4 indústrias beneficiadoras de soja.

Em relação ao sorotipo Cubana, foram obtidos três *clusters* denominados A, B e C. No cluster A agrupou-se as amostras 2365/16 e 4209/16 com, aproximadamente, 84% de similaridade e as demais amostras ficaram em grupos distintos, como mostra a Figura 8. As amostras pertencentes ao *cluster* A foram isoladas da indústria E e do porto para exportação.

As amostras isoladas na indústria A (Figura 8) foram coletadas com dois meses de intervalo, coletadas do mesmo local (pé do elevador de soja).

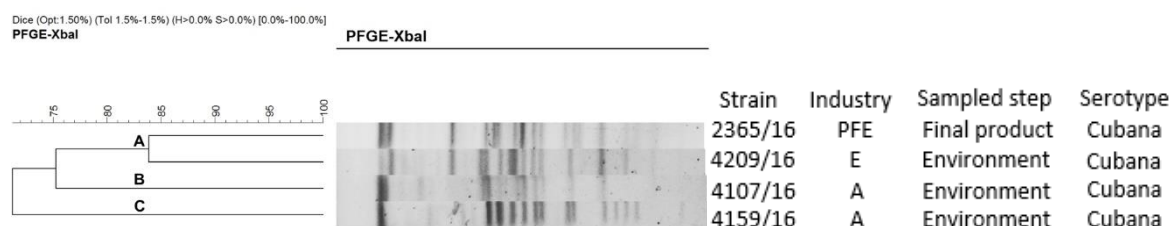


Figura 8: Perfil de digestão pela enzima XbaI e dendrograma de amostras de *Salmonella* Cubana isoladas de 2 indústrias beneficiadoras de soja e porto.

Para a análise epidemiológica, quatro cepas de *S. Mbandaka* e uma cepa de *S. Senftenberg* isoladas neste estudo foram comparadas à base de dados da Fundação Oswaldo Cruz. Os clones de Mbandaka que originaram as amostras 2315/16, 2318/16 e 2236/16 não são exclusivos do estado aonde foram isolados, pois identificaram-se cepas que apresentam de 85 a 95% de similaridade com cepas isoladas do Rio de Janeiro de origem alimentar em 2016. Entretanto, as amostras que compuseram o cluster B (4204/16, 4228/16 e 4191/16) não foram identificadas a mesma similaridade, como mostra a Figura 9.

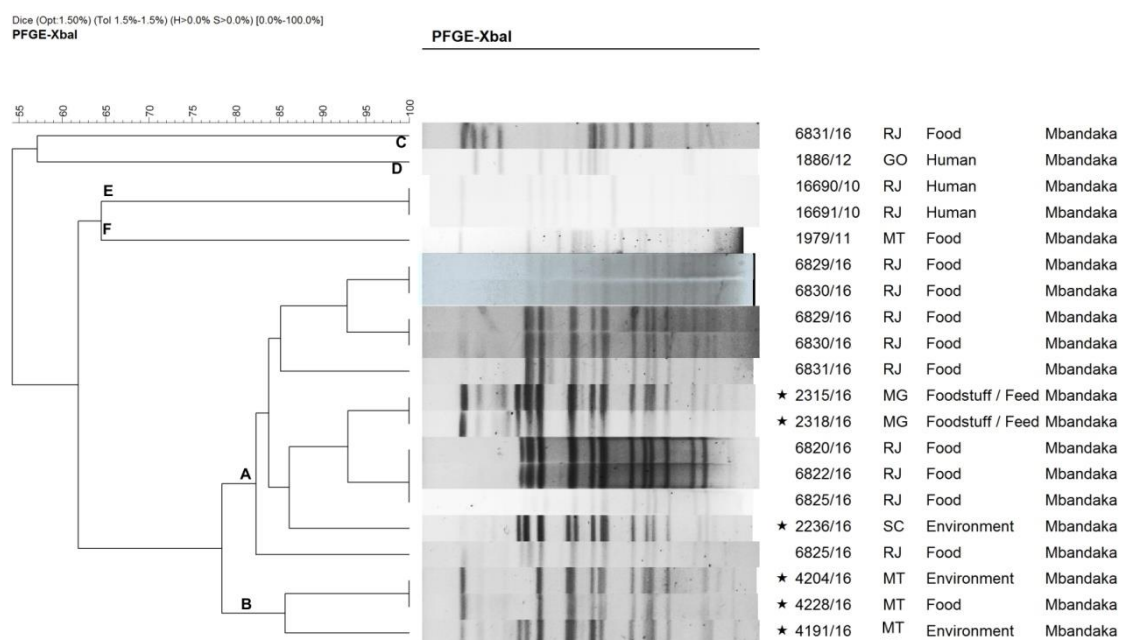


Figura 9: Análise comparativa dos perfis obtidos pela digestão da enzima XbaI das amostras isoladas de 4 indústrias beneficiadoras de soja e amostras do banco de dados da Fiocruz.

A Figura 10 compara uma amostra de *S. Senftenberg* isolada neste estudo e dados obtidos pela Fiocruz. O clone que originou a amostra 2321/16 está bem difundido na região Sul, principalmente no estado de Santa Catarina.

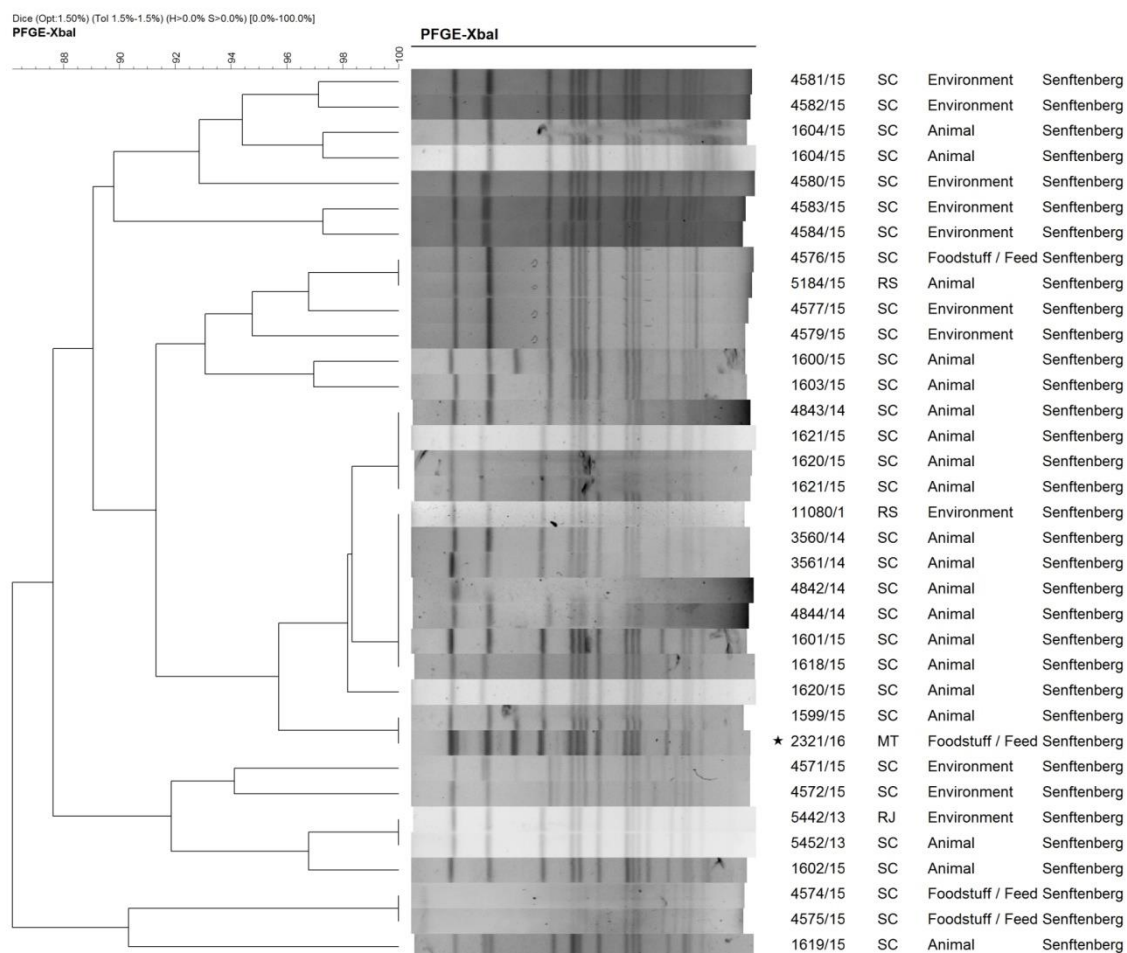
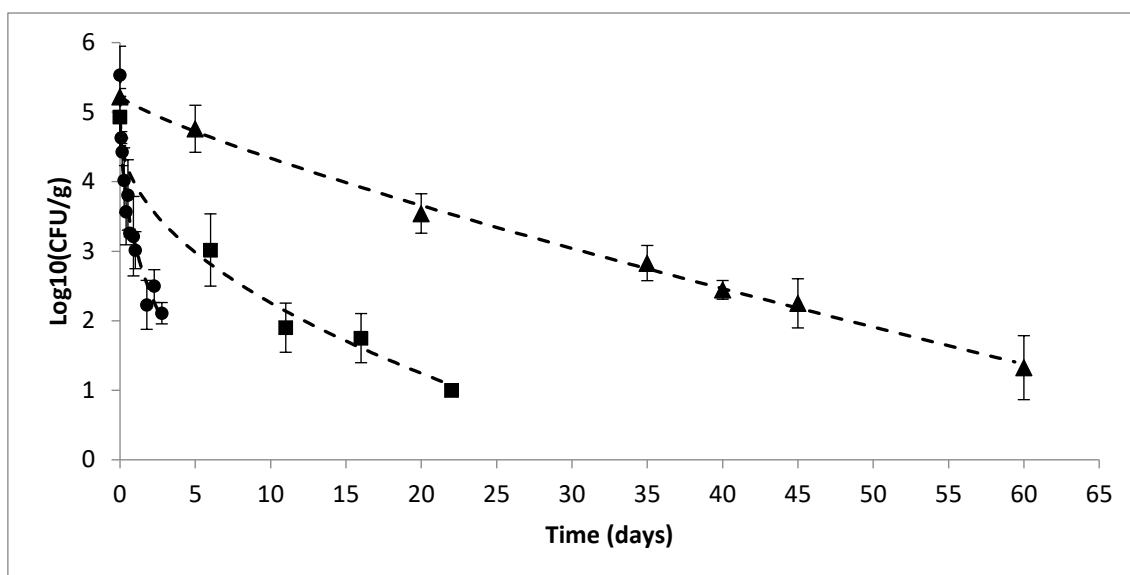


Figura 10: Análise comparativa dos perfis obtidos pela digestão da enzima XbaI de amostras isoladas de indústrias beneficiadoras de soja e amostras do banco de dados da Fiocruz.

Sobrevivência de *Salmonella* Senftenberg em grãos de soja estocados em diferentes temperaturas. O presente estudo investigou a sobrevivência de *Salmonella* Senftenberg em 3 temperaturas diferentes de estocagem (20, 30 e 37°C). Em todas as temperaturas, observou-se uma cinética de inativação de primeira ordem dependente da temperatura, variando apenas o número de dias (Figura 6). Os dados obtidos foram melhor ajustados pelo modelo de Weibull, e os parâmetros de inativação podem ser visualizados na Tabela 7.



Curvas de sobrevivência de *Salmonella* Senftenberg em soja, obtidas pelo modelo de Weibull, nas temperaturas de: ▲ 20°C; ■ 30°C; ● 37°C.

Tabela 7. Parâmetros de sobrevivência da *Salmonella* Senftenberg em grãos de soja.

Temperatura	P	δ	R ²
20°C	0,83 ± 0,21	11,89 ± 2,19 (d)	0,9976
30°C	0,55 ± 0,06	1,93 ± 0,23 (d)	0,9844
37°C	0,36 ± 0,04	0,10 ± 0,08 (d)	0,9730

Onde: P= parâmetro de curvatura (adimensional), δ = tempo primeira redução decimal, R²= coeficiente de determinação

Discussão

Esta pesquisa teve como objetivo principal avaliar a presença de *Salmonella* durante o beneficiamento de soja, um dos principais produtos de exportação do agronegócio brasileiro. Além de isolar e identificar o patógeno em diferentes etapas da cadeia produtiva, este estudo propôs averiguar se a bactéria é persistente no ambiente ou advinda de contaminação cruzada. Por fim, pensando nas condições de estocagem dos grãos de soja destinados à exportação, ensaios de contagem de sobreviventes em diferentes temperaturas foram conduzidos.

O isolamento das bactérias se deu através da coleta de amostras em 5 diferentes indústrias, além de amostras oriundas do porto. Apesar de possuírem pequenas diferenças no fluxograma de processamento, todas as indústrias possuem um “núcleo comum”, onde as etapas e/ou locais de amostragem foram coincidentes. Desta maneira, foi possível estabelecer um parâmetro de comparação entre a contaminação entre as diferentes indústrias. Assim, foram coletadas amostras desde o início do processo, ou seja, grãos de soja sem processamento, até amostras de produto final (farelo) destinados à exportação.

A habilidade de *Salmonella* em sobreviver em produtos com baixa atividade de água já foi discutida por diversos autores (GRUZDEV; PINTO; SELA, 2011; SANTILLANA FARAKOS; FRANK; SCHAFFNER, 2013; WIERUP; KRISTOFFERSEN, 2014). Entretanto, poucos trabalhos identificaram uma variedade tão grande de sorotipos como o do presente estudo. Vinte e nove sorotipos de *Salmonella* foram identificados ao longo das etapas de beneficiamento da soja, com clara prevalência de *Salmonella* Mbandaka. Soares e colaboradores (2010) identificaram 18 sorotipos em indústrias brasileiras de beneficiamento de soja, sendo *S. Cubana* o sorotipo prevalente (em nossa pesquisa, *Salmonella* Cubana foi o segundo sorotipo mais isolado). Dez (n=10) dos sorotipos isolados por Soares e colaboradores correspondem aos sorotipos isolados neste trabalho. Estes dados podem ser indício de uma prevalência de linhagens específicas de *Salmonella* nos ambientes de beneficiamento de soja, podendo indicar persistência da população ao longo dos anos.

Através do mapa de calor estabelecido nesta pesquisa, foi possível notar que *Salmonella* Mbandaka esteve presente em todas as etapas do beneficiamento. A análise de PFGE dos isolados identificados como sorotipo Cubana, pertencentes ao *cluster* A foram isoladas de uma indústria e do porto para exportação, indicando que esta cepa pode ter sido carregada da indústria para o porto, uma vez que a data de coleta da indústria tenha sido 5 meses antes da data de coleta no porto. Outro dado interessante é que as amostras isoladas na indústria A (Figura 8) foram coletadas com dois meses de intervalo, porém são amostras ambientais coletadas do mesmo local, sendo este o pé do elevador de soja. Tal informação indica uma reintrodução do patógeno neste local e nesta indústria.

Em relação a análise epidemiológica o PFGE revelou que o clone que originou a amostra 2321/16 (*Salmonella* Senftenberg) está bem difundido na região Sul, principalmente no estado de Santa Catarina e apresentou 100% de similaridade em comparação com a cepa 1599/15 registrada no banco de dados da FIOCRUZ que foi isolada em 2015 em Santa Catarina. Na ocasião, a cepa 1599/15 teve como fonte de isolamento um animal, podendo indicar que o farelo de soja utilizado para ração animal seja a fonte de contaminação. Entretanto, não há relatos deste sorovar envolvido com surtos ou casos esporádicos de salmonelose no Brasil.

A maioria dos isolados foi obtida a partir das áreas ditas como ambientais do processo, ou seja, áreas sujeitas a uma maior contaminação por agentes externos. De fato, outros autores atribuem ao pó encontrado nestas áreas a presença de *Salmonella* na linha de produção (BOQVIST et al., 2003; DAVIES; WALES, 2013; WIERUP; KRISTOFFERSEN, 2014).

O processamento dos grãos de soja, analisando-se as indústrias separadamente, foi suficiente para eliminar a presença do patógeno no produto final apenas nas fábricas C, D e E (Figura 2). As indústrias A e B ainda apresentaram amostras positivas para presença de *Salmonella* no farelo. De fato, dos 18 sorotipos encontrados em produto final, apenas 5 estavam presentes também em amostras do processo produtivo. Entretanto, os 18 sorotipos foram também isolados de amostras ambientais, evidenciando uma possível re-contaminação do produto final. Outros autores também atribuem a presença de *Salmonella* no produto final como fruto de contaminação cruzada (HUSS et al., 2015; PEREZ-RODRIGUEZ; BEGUM; JOHANNESSEN, 2014). Ao avaliarem os carregamentos de grãos de soja provenientes em sua maioria do Brasil para a Europa, Wierup e Krisoffersen (2014), encontraram *S. Lexington* como um dos sorotipos predominantes. No presente estudo este sorotipo foi isolado apenas no armazém para exportação (porto), indicando este local como possível fonte de contaminação para os carregamentos.

Apesar de a presença da bactéria ser baixa no produto final, poucas células podem ser capazes de provocar enfermidades quando ingeridas (COLEMAN; MARKS, 1999). Portanto, é importante garantir a inocuidade de alimentos consumidos não somente por humanos, mas como ingredientes e insumos utilizados para a produção de ração animal. De fato, *Salmonella* é

considerada pelo Painel dos Riscos Biológicos (BIOHAZ) como o maior perigo de contaminação microbiana para rações animais (EFSA, 2008)

Por ser um produto de baixa atividade de água, a soja não é propícia à multiplicação bacteriana. Entretanto, esta característica proporciona um ambiente adequado para a sobrevivência de células viáveis que, uma vez em contato com condições adequadas, podem vir a se proliferar (FARAKOS; SCHAFFNER; FRANK, 2014; GUPTA; REZENDE; JOSEPH, 2003). *Salmonella* tem a capacidade de suportar diferentes condições de estresse, como estresse osmótico (DENG; LI; ZHANG, 2012) e variações de temperatura (GRUZDEV; PINTO; SELA, 2011), e ainda assim permanecer viável. Devida atenção deve ser dada a soja e seus derivados, pois o processo produtivo de farelo de soja e rações utiliza tratamentos térmicos e diversas etapas de secagem, os quais podem resultar em resistência induzida nas bactérias.

Estudo conduzido por Gruzdev e colaboradores (2011) demonstrou que células de *Salmonella* previamente desidratadas são mais resistentes ao tratamento térmico com calor seco a 100°C. Nesta pesquisa, a população de *Salmonella* foi submetida ao calor por 60 minutos e não houve a completa inativação das células, apenas uma redução de 3 log UFC, enquanto células de *Salmonella* não desidratadas foram inativadas em apenas 10 minutos.

Neste contexto, nossa pesquisa buscou avaliar a sobrevivência de *Salmonella* em um produto de baixa atividade de água e com alto valor de mercado (soja), em diferentes condições de temperatura. Os ensaios conduzidos a 20, 30 e 37°C buscaram reproduzir condições possivelmente encontradas na armazenagem dos grãos antes e durante o transporte para exportação.

A cepa escolhida para o estudo, *Salmonella* Senftenberg 775W, é conhecidamente um dos principais sorotipos isolados de grãos de soja e possui alta resistência térmica (BOQVIST et al., 2003; HALD et al., 2006; LI et al., 2012; PELLEGRINI et al., 2015; SOARES et al., 2010; TORRES et al., 2011; WIERUP; HÄGGBLUM, 2010)

Quando estocados a 20°C, a população de *Salmonella* levou até 11 dias para ser reduzida em um ciclo logarítmico, ao passo que quando armazenados a 37°C, 90% da população foi reduzida em menos de 3 horas. De fato, outros autores afirmam que quando presentes em temperaturas mais baixas, a população bacteriana pode persistir por períodos maiores de tempo

(ALVAREZ-ORDONEZ et al., 2013; FARAKOS; SCHAFFNER; FRANK, 2014; PARK et al., 2015). Em todas as temperaturas testadas, *Salmonella* não foi capaz de se multiplicar, diminuindo portanto, sua população ao longo do tempo.

Apesar de ter a população reduzida mais rapidamente quando em ambientes mais quentes, temperaturas ao redor de 35-37°C são ideais para o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos, onde a maioria dos patógenos se encontra (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Portanto, estas informações corroboram a necessidade de um programa rígido de controle da matéria-prima e processamento (APCC e BPF), afim de manter a carga microbiana incidente baixa, ou até mesmo inativa-la.

A qualidade de ajuste dos dados ao modelo foi analisada de acordo com o coeficiente de determinação (R^2), obtendo valores de 0,9730 (para 37°C), 0,9844 (para 30°C) e 0,9976 (para 20°C).

Estudos de sobrevivência de *Salmonella*, e outros patógenos, são essenciais para se garantir a qualidade não somente dos produtos de exportação, como também para consumo no mercado interno. A potencial resistência cruzada e maior virulência que as cepas de *Salmonella* podem apresentar devido às condições de estresse observadas durante o processamento de soja, farelo e rações é preocupante. A comercialização de rações contaminadas pode ser uma fonte de introdução deste patógeno na cadeia produtiva dos alimentos, sendo de grande importância para a epidemiologia de *Salmonella*.

Referencias

AABO, S. et al. Salmonella identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, p. 171–178, 1993.

ALVAREZ-ORDONEZ, A. et al. Survival of acid adapted and non-acid adapted Salmonella Typhimurium in pasteurized orange juice and yogurt under different storage temperatures. **Food Science and Technology International**, v. 19, n. 5, p. 407–414, 2013.

ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. In: **Bacteriological Analytical Manual**. 8ª ed. [s.l.: s.n.].

ANONYMOUS. ISO/TS 6579-2. Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of salmonella — . 2002.

BOQVIST, S. et al. Salmonella isolated from animals and feed production in

Sweden between 1993 and 1997. **Acta Vet. Scand.**, v. 44, n. 3, p. 181–197., 2003.

BRASIL. **Doenças Transmitidas por Alimentos.**

CASTRO-IBÁÑEZ, I. et al. Identification of Sampling Points Suitable for the Detection of Microbial Contamination in Fresh-cut Processing Lines. **Food Control**, v. 59, p. 841–848, 2015.

CDC. **Multistate Outbreak of Human Salmonella Infantis Infections Linked to Dry Dog Food (Final Update).** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/dog-food-05-12/index.html>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

CDC. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157 : H7 , Escherichia coli non - O157 (STEC), Salmonella serotypes , Shigella sonnei and Shigella flexneri. 2013.

CDC. **Salmonella Montevideo and Salmonella Senftenberg Infections Linked to Wonderful Pistachios.**

CHIOU, C. et al. International Journal of Food Microbiology Usefulness of pulsed-field gel electrophoresis profiles for the determination of Salmonella serovars. **International Journal Food Microbiology**, v. 214, p. 1–3, 2015.

COLEMAN, M. E.; MARKS, H. M. Qualitative and quantitative risk assessment. **Food Control**, v. 10, n. 4–5, p. 289–297, 1999.

CONAB. **Acompanhamento da Safra brasileira de grãos - Terceiro levantamento - Dezembro de 2016.** [s.l.: s.n.].

COSSI, M. V. C. et al. Low occurrence of Salmonella in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. **Food Control**, v. 40, n. 1, p. 320–323, 2014.

CRUCELLO, A. et al. Analysis of genomic regions of Trichoderma harzianum IOC-3844 related to biomass degradation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–21, 2015.

DAVIES, R. H.; WALES, A. D. Salmonella contamination of cereal ingredients for animal feeds. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3–4, p. 543–549, 2013.

DAVIS, M. A. et al. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica. **Veterinary Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 199–210, 2003.

DELHALLE, L. et al. Salmonella surveillance and control at post-harvest in the Belgian pork meat chain. **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 265–271, 2009.

DENG, X.; LI, Z.; ZHANG, W. Transcriptome sequencing of Salmonella enterica serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 311–315, 2012.

EFSA. **Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards**The EFSA Journal. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/pt/articulos/Archivo297/BIOHAZ_PiensosSalmonella08.pdf>.

EUROPEAN COMMISSION. **The Rapid Alert System for Food and Feed - 2015 Annual Report.** [s.l: s.n.].

FAO. **General standard for contaminants and toxins in food and feed.**

FARAKOS, S. M. S.; SCHAFFNER, D. W.; FRANK, J. F. Predicting Survival of Salmonella in Low – Water Activity Foods: An Analysis of Literature Data t. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 9, p. 1448–1461, 2014.

GRIMONT, P.; WEILL, F. **Antigenic Formulae of the Salmonella serovars.** Paris: [s.n.].

GRUZDEV, N.; PINTO, R.; SELA, S. Effect of desiccation on tolerance of Salmonella enterica to multiple stresses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1667–1673, 2011.

GUPTA, A. R.; REZENDE, C. L. E. DE; JOSEPH, S. W. Induction and Resuscitation of Viable but Nonculturable Salmonella enterica Serovar Typhimurium DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6669–6675, 2003.

HALD, T. et al. Human Health Impact of Salmonella Contamination in Imported Soybean Products: A Semiquantitative Risk Assessment. **Foodborne pathogens and disease**, v. 3, n. 4, p. 422–431, 2006.

HALD, T. et al. **Assessment of the human-health impact of Salmonella in animal feed.** [s.l: s.n.].

HUSS, A. R. et al. Evaluation of a Biological Pathogen Decontamination Protocol for Animal Feed Mills. **Journal of Food Protection**, v. 9, p. 1682–1688, 2015.

JACXSENS, L. et al. Measuring microbial food safety output and comparing self-checking systems of food business operators in Belgium. **Food Control**, v. 49, p. 59–69, 2015.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology.** 7th. ed. [s.l.] Springer, 2005.

LI, X. et al. Surveillance of Salmonella prevalence in animal feeds and characterization of the Salmonella isolates by serotyping and antimicrobial susceptibility. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, n. 8, p. 692–8, 2012.

MAFART, P. et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 107–113, 2002.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39–48, 2003.

MANZINI, R.; ACCORSI, R. The new conceptual framework for food supply chain assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 251–263, 2013.

PARK, S. et al. Fate of mesophilic aerobic bacteria and Salmonella enterica on the surface of eggs as affected by chicken feces, storage temperature, and relative humidity. **Food Microbiology**, v. 48, p. 200–205, 2015.

PAUCAR-MENACHO, L. M. et al. A high-protein soybean cultivar contains lower isoflavones and saponins but higher minerals and bioactive peptides than a low-protein cultivar. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 15–21, 2010.

PEDERSEN, T. B.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Persistence of *Salmonella* Senftenberg in poultry production environments and investigation of its resistance to desiccation. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 37, n. 4, p. 421–7, 2008.

PELLEGRINI, D. DA C. P. et al. Distribution of *Salmonella* clonal groups in four Brazilian feed mills. **Food Control**, v. 47, p. 672–678, 2015.

PEREZ-RODRIGUEZ, F.; BEGUM, M.; JOHANNESSEN, G. S. Study of the cross-contamination and survival of *Salmonella* in fresh apples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 184, p. 92–97, 2014.

PRUNIĆ, B. et al. Clonal persistence of *Salmonella enterica* serovars Montevideo, Tennessee, and infantis in feed factories. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 6, p. 662–666, 2016.

SANT'ANA, A. S. et al. Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1235–1237, 2011.

SANT'ANA, A. S. et al. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 52–58, 2012.

SANTILLANA FARAKOS, S. M.; FRANK, J. F.; SCHAFFNER, D. W. Modeling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of *Salmonella* in low-moisture foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 280–293, 2013.

SCHELIN, J. et al. Evaluation of pre-PCR processing approaches for enumeration of *Salmonella enterica* in naturally contaminated animal feed. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 167–178, 2014.

SOARES, C. M. et al. **Salmonella spp detection in soybean meal samples from crushing plants in Brazil**. The EC Review Meeting and 4th General Meeting. **Anais...**Copenhagen: 2010

TORRES, G. J. et al. The prevalence of *Salmonella enterica* in Spanish feed mills and potential feed-related risk factors for contamination. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, n. 2–3, p. 81–87, 2011.

WIERUP, M.; HÄGGBLUM, P. An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of *Salmonella* contamination in pig production. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 15, 2010.

WIERUP, M.; KRISTOFFERSEN, T. Prevention of *Salmonella* contamination of finished soybean meal used for animal feed by a Norwegian production plant despite frequent *Salmonella* contamination of raw soy beans, 1994-2012. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, p. 41, 2014.

WILLIS, S. **The use of Soybean Meal and Full Fat Soybean Meal by the**

Animal Feed Industry. 12th Australian Soybean Conference. **Anais...**Australia: 2003

ZOU, W. et al. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis profiles for identification of Salmonella serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3122–3126, 2010.

DISCUSSÃO GERAL

Como um dos principais exportadores do agronegócio mundial, o Brasil pode desempenhar papel chave na disseminação da contaminação microbiológica das matérias-primas agropecuárias, que posteriormente podem ser associadas à ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Produtos agropecuários, tanto de origem animal quanto vegetal, podem ser veiculadores de micro-organismos patogênicos, dentre os quais pode-se destacar *Salmonella*. *Salmonella* é o principal agente causador de DTAs nos casos de surtos de DTA elucidados no Brasil. Apesar de ser uma bactéria cujo habitat primário é o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, são cada vez mais frequentes os relatos sobre a ocorrência de *Salmonella* em diferentes substratos e ambientes.

Neste contexto, as matérias-primas produzidas em larga escala, cuja cadeia produtiva engloba diversas operações de transformação e transporte e que possuem aplicações em diversos produtos, podem ser particularmente críticas quanto à contaminação e potencial de disseminação de *Salmonella*. Dentre as matérias-primas produzidas em larga escala, a soja merece destaque.

A soja, *commodity* com ampla comercialização mundial nas mais diversas formas (grão, farelo e óleo), percorre um longo caminho do campo até a mesa do consumidor. Além de ser usada como fonte de alimento humano, a soja é substrato para a produção de rações animais (tanto rações para *pet* quanto rações para animais de produção, como gado para corte, aves e peixes). Neste trajeto, está sujeita a diferentes variações ambientais, e também à uma intensa manipulação, contato com diversas superfícies e com vetores de contaminação microbiológica tais como pragas diversas. Apesar dos grãos de soja e derivados, em sua maioria, não se constituírem em substratos adequados para a multiplicação de *Salmonella*, sabe-se que este micro-organismo pode sobreviver sob longos períodos em ambientes com baixa atividade de água. Fenômenos como a “proteção cruzada”, oriundos da exposição de células de *Salmonella* à condições de estresse, podem resultar num aumento da resistência deste micro-organismo frente a tratamentos térmicos ou químicos, resultando em sérios problemas de saúde pública e animal.

Considerando-se o exposto, no presente trabalho estudou-se a prevalência de *Salmonella* desde os grãos de soja, passando por ambientes internos e externos de indústrias beneficiadoras de soja, chegando até um dos seus produtos finais, o farelo. O intuito desta etapa foi averiguar se, de fato, *Salmonella* poderia estar presente ao longo de toda a cadeia de processamento da soja. As análises conduzidas na matéria-prima (neste caso, os grãos de soja – n=179) não revelaram a presença de *Salmonella*. Contudo, um total de 834 isolados presuntivos de *Salmonella* foram recuperados a partir de amostras coletadas em diferentes locais das 5 indústrias e 2 armazéns para exportação analisados e localizadas em 5 diferentes estados. As amostras provenientes das áreas externas (pé do elevador), foram as que apresentaram maior prevalência de *Salmonella* (3,36% do total de amostras analisadas). A elevada prevalência (85,71%) de *Salmonella* neste ponto de amostragem está relacionada, principalmente, à grande quantidade de pó encontrada nas áreas externas e a presença de animais silvestres que são atraídos pela oferta de alimento como o grão de soja. Desta forma, controle de pragas, e um programa de limpeza e sanitização rígido destes locais, constituem-se medidas que podem contribuir para a diminuição da prevalência de *Salmonella* nestas amostras.

Ao se conduzir os ensaios de sorotipagem nos 404 isolados de *Salmonella*, observou-se a prevalência de 29 diferentes sorotipos, sendo a seguinte distribuição observada: Mbandaka(n= 109), Cubana (n=47), Agona (n=41), Infantis (n=21), Anatum (n=19), Ohio (n=18), Heidelberg (n=17), Akuafo (n=16), Montevideo (n=15), Rugosa (n=14), Derby (n=12), Typhimurium (n=12), Tennessee (n=8), enterica (O:6,7) (n=8), enterica (O:3,10) (n=6), Idikan (n=5), Worthington (n=5), Senftenberg (n=5), Morehead (n=4), Bredeney (n=3), Brooklyn (n=3), Havana (n=3), Lexington (n=3), Schwarzengrund (n=3), Abony (n=2), enterica (O:4,5) (n=2), enterica (O:3,10:e,h:-) (n=1), enterica (O:16) (n=1) e enterica (O:6,8) (n=1). De maneira geral, o sorotipo mais comumente isolado historicamente no Brasil é o Typhimurium.

Além da sorotipagem, conduziu-se a subtipagem molecular utilizando-se a técnica de PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*). A partir dos resultados da PFGE, pode-se afirmar se um isolado de *Salmonella*, encontrado na matéria-prima, por exemplo, é clone de outra *Salmonella* isolada no ambiente de processamento ou produto final. Neste caso, pode-se afirmar que a cepa está

persistindo no ambiente, e que medidas mais severas de higiene deveriam ser adotadas para eliminação do patógeno. A partir das amostras analisadas no presente estudo, foi possível observar que os sorotipos Cubana e Mbandaka podem ser considerados amplamente difundidos nas indústrias beneficiadoras de soja e armazéns para exportação de grãos e farelo de soja. Caso diferentes clones sejam encontrados ao longo do processo produtivo, poderíamos inferir que uma contaminação cruzada (ou recontaminação) poderia estar em andamento, bem como a reintrodução do patógeno no processo produtivo.

Considerando-se a ausência de *Salmonella* nas amostras de grãos de soja, foram planejados experimentos para avaliar a sobrevivência deste micro-organismo nos grãos de soja. Os ensaios foram conduzidos em três temperaturas diferentes (20°C, 30°C e 37°C), seguindo-se contagem de sobreviventes e determinação dos parâmetros cinéticos através de modelos preditivos. Para estes experimentos suspensões de células de *Salmonella* Senftenberg 775w (S87) foram escolhidas para os ensaios devido à sua conhecida resistência térmica e à desidratação. Os resultados obtidos indicam que quando os grãos de soja foram estocados a 20°C, foram necessários até 60 dias para a redução em 4 ciclos logarítmicos na população de *Salmonella* Senftenberg 775w (S87). Já quando os grãos de soja foram estocados a 37°C, a redução em 4 ciclos logarítmicos ocorreu em aproximadamente 2 dias. Estes resultados demonstram que a temperatura exerce claramente um efeito protetor sobre as células de *Salmonella*. Mesmo verificando a redução da população a mesma persistiu por longo período de tempo quando estocadas a 20°C. Outros fatores, além da temperatura, podem estar envolvidos nessa redução, como por exemplo a presença de antimicrobianos nos grãos de soja, como sugeridos por outros autores (HASSAN *et al*,2010; BOIA,2013) entretanto análises desta natureza não estavam no escopo desta pesquisa.

CONCLUSOES GERAIS

Os resultados da presente pesquisa indicam que a prevalência de *Salmonella* é baixa nos grãos de soja (n=0, dentre as amostras analisadas), elevada nas amostras ambientais (n=70, correspondente a 47,3% das amostras analisadas) e mediana no farelo (n=14, considerando-se o farelo e o produto final para exportação, correspondendo a 16% das amostras analisadas).

O sorotipo Mbandaka foi prevalente, respondendo por 27% dos isolados identificados (n=109). A análise de PFGE indicou a presença de cepas oriundas do mesmo clone em diferentes dias de coleta realizadas em uma mesma indústria, indicando a difusão deste clone ao longo da linha de processamento. Em relação ao sorotipo Cubana o mesmo clone foi encontrado em duas indústrias distintas, indicando a difusão da contaminação entre diferentes sítios. A contaminação, em ambos os casos, é oriunda do ambiente de processamento, visto que não foram recuperados isolados a partir dos grãos de soja. Medidas de controle da higiene ambiental devem ser adotadas visando-se reduzir as populações de *Salmonella* no ambiente de processamento da soja.

As análises das curvas de sobreviventes de *Salmonella*, realizadas a partir da inoculação em grãos de soja e estocadas em diferentes temperaturas (20, 30 e 37°C), indicam que se presentes em altas concentrações, as populações permanecem viáveis por mais de 60 dias (temperatura de incubação de 20°C). Este resultado reforça a necessidade de adoção de medidas preventivas mais rigorosas.

Esta pesquisa demonstrou com êxito que as indústrias beneficiadoras de soja podem ser veiculadoras de células de *Salmonella*, exigindo a adoção de protocolos mais rígidos de BPF (boas práticas de fabricação) e APPCC (análise de perigos e pontos críticos de controle). Além disso, quando presentes no ambiente, clones de *Salmonella* tem a capacidade de persistir no ambiente de produção, podendo ser difundidas inclusive para outras indústrias, evidenciando processos falhos de controle. Por fim, ensaios de sobrevivência de *Salmonella* podem prever, com segurança, o comportamento da população bacteriana frente a diferentes temperaturas, sendo importante aliado das indústrias.

REFERENCIAS GERAIS

- AABO, S. et al. Salmonella identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, p. 171–178, 1993.
- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 3ª ed. [s.l.] Guildford, 2008.
- AGRIC. **Cultivo da soja no Brasil**. Disponível em: <http://www.agric.com.br/producoes/cultivo_da_soja.html>.
- ALBUQUERQUE, R.; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Study of occurrence of salmonelas in feedstuffs, feeds and dust swabs in feed mill. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, 1999.
- ALJARALLAH, K. M.; ADAMS, M. R. Mechanisms of heat inactivation in Salmonella serotype Typhimurium as affected by low water activity at different temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 153–160, 2007.
- ALVAREZ-ORDONEZ, A. et al. Survival of acid adapted and non-acid adapted Salmonella Typhimurium in pasteurized orange juice and yogurt under different storage temperatures. **Food Science and Technology International**, v. 19, n. 5, p. 407–414, 2013.
- ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. In: **Bacteriological Analytical Manual**. 8ª ed. [s.l.: s.n.].
- ANONYMOUS. ISO/TS 6579-2. Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of salmonella —. . 2002.
- ANONYMOUS. **Annual Report on Zoonoses in Denmark 2013** National Food Institute, Technical University of Denmark. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.google.com/search?source=ig&hl=en&rlz=1G1TSAUCENAU379&=&q=Annual+report+on+zoonoses+in+denmark+1998&aq=f&aql=&aqi=&oq=&gs_rfai=>>.
- ANTOLA, A.-S. **Salmonella enterica in Swine Feed Ingredients: A Review and Implications for Control Policies**. [s.l.] University of Helsinki, 2013.
- ARCHER, J. et al. Heat Resistance of Salmonella weltevreden in Low-Moisture Environments. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 8, p. 969–973, 1998.
- AVILES, B. et al. Survival of Salmonella enterica Serotype Tennessee during Simulated Gastric Passage Is Improved by Low Water Activity and High Fat Content. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 2, p. 333–337, 2013.

- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 199–218, 1995.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A.; MCCLURE, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiol**, v. 10, p. 43–59, 1993.
- BARRILE, J. C.; CONE, J. F. Effect of added moisture on the heat resistance of *Salmonella anatum* in milk chocolate. **Applied microbiology**, v. 19, n. 1, p. 177–178, 1970.
- BEHRAVESH, C. B. et al. Human *Salmonella* infections linked to contaminated dry dog and cat food, 2006-2008. **Pediatrics**, v. 126, n. 3, p. 477–483, 2010.
- BEUCHAT, L. R.; DOYLE, M. P. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 3^a ed. [s.l.] ASM, 2007.
- BEUCHAT, L. R.; MANN, D. A. Survival of *Salmonella* in Cookie and Cracker Sandwiches Containing Inoculated , Low – Water Activity Fillings. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 10, p. 1828–1834, 2015.
- BIGELOW, W. D.; ESTY, J. R. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 602–617, 1920.
- BLESSINGTON, T.; MITCHAM, E. J.; HARRIS, L. J. Survival of *Salmonella enterica* , *Escherichia coli* O157 : H7 , and *Listeria monocytogenes* on Inoculated Walnut Kernels during Storage. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 245–254, 2012.
- BOARINI, L.; BERALDO-MASSOLI, M. C.; CASAGRANDE, M. F. Identification of *Clostridium perfringens* and *Salmonella* spp . in Swine Through PCR. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 55, n. December, p. 1–7, 2015.
- BOQVIST, S. et al. *Salmonella* isolated from animals and feed production in Sweden between 1993 and 1997. **Acta Vet. Scand.**, v. 44, n. 3, p. 181–197., 2003.
- BRASIL. **Regulamento Técnico da Soja, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade intrínseca e extrínseca, a amostragem e a marcação ou rotulagem**. [s.l.: s.n.].
- BRASIL. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA**. [s.l.: s.n.].
- BRASIL. **Doenças Transmitidas por Alimentos**.
- BUCHANAN, R. L. Developing and distributing user-friendly application software.

Journal of Industrial Microbiology, v. 12, n. 3–5, p. 251–255, 1993a.

BUCHANAN, R. L. Predictive food microbiology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, n. January, 1993b.

BURNS, A. M. et al. **The Link Between Feed and Salmonella**. Pig Farmers' Conference 2012. **Anais...**2014

CANÇADO, R. A. **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E MICOTOXICOLÓGICA DE GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* Linné) E SOJA (*Glycine max.* (Linné) Merrill) PROVENIENTES DE CULTIVO CONVENCIONAL DAS SEMENTES NATURAIS E GENETICAMENTE MODIFICADAS**. [s.l: s.n.].

CARVALHO, E. R. et al. Performance of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars in the summer cropping in the south of Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 892–899, 2010.

CARVALHO, V. G. **DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA PARA A DOSAGEM DE MICRONUTRIENTES PARA RAÇÃO ANIMAL**. [s.l: s.n.].

CASTRO-IBÁÑEZ, I. et al. Identification of Sampling Points Suitable for the Detection of Microbial Contamination in Fresh-cut Processing Lines. **Food Control**, v. 59, p. 841–848, 2015.

CDC. **Multistate Outbreak of Salmonella Serotype Agona Infections Linked to Toasted Oats Cereal**. [s.l: s.n.].

CDC. **Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996--2010** Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). [s.l: s.n.].

CDC. **Multistate Outbreak of Human Salmonella Infantis Infections Linked to Dry Dog Food (Final Update)**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/dog-food-05-12/index.html>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

CDC. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157 : H7 , *Escherichia coli* non - O157 (STEC), *Salmonella* serotypes , *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2013.

CDC. **Salmonella Montevideo and Salmonella Senftenberg Infections Linked to Wonderful Pistachios**.

CDC. **List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations**.

CHIOU, C. et al. International Journal of Food Microbiology Usefulness of pulsed-

- field gel electrophoresis profiles for the determination of *Salmonella* serovars. **International Journal Food Microbiology**, v. 214, p. 1–3, 2015.
- CHUNG, K. C.; GOEPFERT, J. M. Growth of *Salmonella* at low pH. **Journal of Food Science**, v. 35, p. 326–328, 1970.
- COELI, C. C. DE M. **Análise da Demanda por Transporte Ferroviário: O Caso do Transporte de Grãos e Farelo de Soja na Ferronorte**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- COLEMAN, M. E.; MARKS, H. M. Qualitative and quantitative risk assessment. **Food Control**, v. 10, n. 4–5, p. 289–297, 1999.
- CONAB. **Acompanhamento da Safra brasileira de grãos - Terceiro levantamento - Dezembro de 2016**. [s.l.: s.n.].
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Quarto levantamento**. Brasília: [s.n.].
- COSSI, M. V. C. et al. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. **Food Control**, v. 40, n. 1, p. 320–323, 2014.
- CRUCELLO, A. et al. Analysis of genomic regions of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 related to biomass degradation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–21, 2015.
- CVE/DDTHA. **DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ÁGUA E ALIMENTOS SALMONELLA ENTERITIDIS/SALMONELOSES. Informe NET DTA**. [s.l.: s.n.].
- DA SILVA, F. F. P. et al. Occurrence of *Salmonella* spp. and generic *Escherichia coli* on beef carcasses sampled at a Brazilian slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 17–23, 2014.
- DAVIES, R. H.; WALES, A. D. *Salmonella* contamination of cereal ingredients for animal feeds. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3–4, p. 543–549, 2013.
- DAVIS, M. A. et al. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. **Veterinary Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 199–210, 2003.
- DEAGRO. **Informativo DEAGRO/FIESP. Safra Mundial de Soja 2014/15 – Abril de 2015 - 12º Levantamento do USDA**. [s.l.: s.n.].
- DELHALLE, L. et al. *Salmonella* surveillance and control at post-harvest in the Belgian pork meat chain. **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 265–271, 2009.
- DENG, X.; LI, Z.; ZHANG, W. Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. **Food**

Microbiology, v. 30, n. 1, p. 311–315, 2012.

DEVLIEGHERE, F. et al. Predictive Microbiology. In: COSTA, R.; KRISTBERGSSON, K. (Eds.). . **Predictive Modeling and Risk Assessment**. [s.l.] Springer Science+Business Media, 2009. p. 101–119.

DODD, C. E. R.; RICHARDS, P. J.; ALDSWORTH, T. G. Suicide through stress: A bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 46–50, 2007.

DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. L. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 4^a ed. [s.l.] ASM, 2013.

EFSA. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards The EFSA Journal. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal/doc/297/BIOHAZ_PiensosSalmonella08.pdf>.

EFSA. Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 Part B: factors associated with Salmonella pen positivityEFSA Journal. [s.l: s.n.].

EUROPEAN COMMISSION. **The Rapid Alert System for Food and Feed - 2015 Annual Report.** [s.l: s.n.].

FAO. General standard for contaminants and toxins in food and feed.

FARAKOS, S. M. S.; FRANK, J. F.; SCHAFFNER, D. W. International Journal of Food Microbiology Modeling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of Salmonella in low-moisture foods. **International Journal Food Microbiology**, v. 166, p. 280–293, 2013.

FARAKOS, S. M. S.; HICKS, J. W.; FRANK, J. F. Temperature Resistance of Salmonella in Low – Water Activity Whey Protein Powder as Influenced by Salt Content. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 4, p. 631–634, 2014.

FARAKOS, S. M. S.; SCHAFFNER, D. W.; FRANK, J. F. Predicting Survival of Salmonella in Low – Water Activity Foods: An Analysis of Literature Data t. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 9, p. 1448–1461, 2014.

FDA. Approximate pH of Foods and Food Products. p. 1–13, 2007.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 5ª ed. [s.l.] Manole, 2015.

GOEPFERT, J. M.; BIGGIE, R. A. Heat Resistance of *Salmonella typhimurium*

- and Salmonella senftenberg 775W in Milk Chocolate. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 1939–1940, 1968.
- GRASSO, E. Thermal Resistance of Salmonella and E. coli in Low Water Activity Foods Low Water Activity Products. 2014.
- GRIMONT, P.; WEILL, F. **Antigenic Formulae of the Salmonella serovars**. Paris: [s.n.].
- GRUZDEV, N.; PINTO, R.; SELA, S. Effect of desiccation on tolerance of Salmonella enterica to multiple stresses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1667–1673, 2011.
- GUIMARÃES JÚNIOR, M. A. P. **Aplicação de HACCP e técnicas estatísticas em uma fábrica de farelo de soja**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- GUPTA, A. R.; REZENDE, C. L. E. DE; JOSEPH, S. W. Induction and Resuscitation of Viable but Nonculturable Salmonella enterica Serovar Typhimurium DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6669–6675, 2003.
- HÄGGBLÖM PER. **Control of feed in Sweden Salmonella in the feed chain, Biotracer**. Uppsala: [s.n.].
- HALD, T. et al. Human Health Impact of Salmonella Contamination in Imported Soybean Products: A Semiquantitative Risk Assessment. **Foodborne pathogens and disease**, v. 3, n. 4, p. 422–431, 2006.
- HALD, T. et al. **Assessment of the human-health impact of Salmonella in animal feed**. [s.l.: s.n.].
- HAMMACK, T. Salmonella species. In: LAMPEL, K.; AL-KHALDI, S.; CAHILL, S. (Eds.). **Bad Bug Book**. 2nd. ed. [s.l.: s.n.]. p. 9–12.
- HE, Y. et al. Increased Water Activity Reduces the Thermal Resistance of Salmonella enterica in Peanut Butter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4763–4767, 2013.
- HOKUNAN, H. et al. Survival Kinetics of Salmonella enterica and Enterohemorrhagic Escherichia coli on a Plastic Surface at Low Relative Humidity and on Low – Water Activity Foods. **Journal of Food Protection**, v. 79, p. 1680–1692, 2016.
- HUSS, A. R. et al. Evaluation of a Biological Pathogen Decontamination Protocol for Animal Feed Mills. **Journal of Food Protection**, v. 9, p. 1682–1688, 2015.

- JACKSON, B. R. et al. Outbreak-associated *Salmonella enterica* Serotypes and Food Commodities, United States, 1998–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, p. 1239–1244, ago. 2013.
- JACXSENS, L. et al. Measuring microbial food safety output and comparing self-checking systems of food business operators in Belgium. **Food Control**, v. 49, p. 59–69, 2015.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7th. ed. [s.l.] Springer, 2005.
- JONES, F. T. A review of practical *Salmonella* control measures in animal feed. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 1, p. 102–113, 2011.
- JUNEJA, V. J.; SOFOS, J. N. **Pathogens and Toxins in Food: Challenges and Interventions**. Washington: ASM, 2009.
- JUNG, Y. S.; BEUCHAT, L. R. Survival of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in egg powders as affected by water activity and temperature. **International Journal Food Microbiology**, v. 49, p. 1–8, 1999.
- JUVEN, B. J. et al. Survival of *Salmonella* in Dry Food and Feed. **Journal of Food Protection**, v. 47, p. 445–448, 1984.
- KIRK, M. D. et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1–21, 2015.
- KOTZEKIDOU, P. Microbial Stability and Fate of *Salmonella Enteritidis* in Halva, a Low-Moisture Confection. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 181–185, 1998.
- KOUTSOUMANIS, K. P.; ASPRIDOU, Z. Individual cell heterogeneity in Predictive Food Microbiology: Challenges in predicting a “noisy” world. **International Journal of Food Microbiology**, 2016.
- KOUTSOUMANIS, K. P.; LIANOU, A. Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2294–2301, 2013.
- KRAPF, T.; GANTENBEIN-DEMARCHI, C. Thermal inactivation of *Salmonella* spp. during conching. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 720–723, 2010.
- LACONCHA, I. et al. Genotypic characterisation by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human

sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 155–165, 2000.

LARA, M. A. M. **Processo de Produção de Ração - Moagem (Parte 1)**.

LI, X. et al. Surveillance of Salmonella prevalence in animal feeds and characterization of the Salmonella isolates by serotyping and antimicrobial susceptibility. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, n. 8, p. 692–8, 2012.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 310–321, 2013.

LOMBARD, J. E. et al. Comparison of individual, pooled, and composite fecal sampling methods for detection of Salmonella on U.S. dairy operations. **Journal of food protection**, v. 75, n. 9, p. 1562–71, 2012.

LYNCH, M. F.; TAUXE, R. V.; HEDBERG, C. W. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 3, p. 307–315, 2009.

MA, L. I. et al. Thermal Inactivation of Salmonella in Peanut Butter. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 8, p. 1596–1601, 2009.

MACKEY, B. M.; DERRICK, C. M. Changes in the heat resistance of Salmonella typhimurium during heating at rising temperatures. **Letters in Applied Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 13–16, 1987.

MAFART, P. et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 107–113, 2002.

MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155–161, 2005.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39–48, 2003.

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. **Tecnologia para Produção de Óleo de Soja: Descrição das Etapas, Equipamentos, Produtos e Subprodutos**. [s.l: s.n.].

MANZINI, R.; ACCORSI, R. The new conceptual framework for food supply chain assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 251–263, 2013.

- MCDONALD, K.; SUN, D.-W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, n. 1–2, p. 1–27, 1999.
- MCMEEKIN, T. A. et al. **Predictive Microbiology : Theory and Application**. Taunton: Research Studies Press, 1993.
- MCMEEKIN, T. A. et al. Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 2–3, p. 395–407, 2002.
- MEDEIROS, M. A. N. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 30, n. 6, p. 555–560, 2011.
- MILNER, K. C.; SHAFFER, M. F. Bacteriologic Studies of Experimental Salmonella Infections in Chicks. **Journal of Infectious Diseases**, v. 90, n. 1, p. 81–96, 1952.
- MISSAO, M. R. Soybean : Origin , Classification , Use and an Including Vision of Market. **Revsita de Ciencias Empresariais**, v. 3, p. 7–15, 2006.
- MUÑOZ-CUEVAS, M.; METRIS, A.; BARANYI, J. Predictive modelling of Salmonella: From cell cycle measurements to e-models. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 852–862, 2012.
- MURASE, T. et al. Evaluation of DNA Fingerprinting Epidemiologic Tool for Salmonella by PFGE as an Infections. **Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 9, p. 673–676, 1995.
- NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 41–51, 2000.
- NASCIMENTO, M. S. et al. Inactivation of Salmonella during cocoa roasting and chocolate conching. **International Journal Food Microbiology**, v. 159, p. 225–229, 2012.
- NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N. **Características da soja**.
- ORLOVSKIS, Z. et al. Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. **Current Opinion in Insect Science**, v. 9, p. 16–23, 2015.
- PANG, J. C. et al. A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests

- a major world-wide clone of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 305–312, 2007.
- PARDI, M. C. **Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação**. [s.l.] Universidade Federal Fluminense. EDUFF - Editora Universitária, 2001.
- PARK, S. et al. Fate of mesophilic aerobic bacteria and *Salmonella enterica* on the surface of eggs as affected by chicken feces, storage temperature, and relative humidity. **Food Microbiology**, v. 48, p. 200–205, 2015.
- PAUCAR-MENACHO, L. M. et al. A high-protein soybean cultivar contains lower isoflavones and saponins but higher minerals and bioactive peptides than a low-protein cultivar. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 15–21, 2010.
- PEDERSEN, T. B.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Persistence of *Salmonella* Senftenberg in poultry production environments and investigation of its resistance to desiccation. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 37, n. 4, p. 421–7, 2008.
- PELEG, M.; COLE, M. B. Reinterpretation of microbial survival curves. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 38, n. 5, p. 353–380, 1998.
- PELLEGRINI, D. C. P. **Avaliação dos pontos de contaminação por *Salmonella* sp. e coliformes totais durante o preparo de dietas para suínos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.
- PELLEGRINI, D. DA C. P. et al. Distribution of *Salmonella* clonal groups in four Brazilian feed mills. **Food Control**, v. 47, p. 672–678, 2015.
- PEREZ-RODRIGUEZ, F.; BEGUM, M.; JOHANNESSEN, G. S. Study of the cross-contamination and survival of *Salmonella* in fresh apples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 184, p. 92–97, 2014.
- PETKAR, A. et al. Survival of *Salmonella* in Organic and Conventional Broiler Feed as Affected by Temperature and Water Activity. **Agriculture, Food and Analytical Bacteriology**, v. 1, p. 175–185, 2011.
- PIPOLO, A. E. et al. **Teores de óleo e proteína em soja: fatores envolvidos e qualidade para a indústria**. [s.l.: s.n.].
- PRUNIĆ, B. et al. Clonal persistence of *Salmonella enterica* serovars Montevideo, Tennessee, and infantis in feed factories. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 6, p. 662–666, 2016.
- PUKASIEWICZ, S. R. M.; OLIVEIRA, I. L. DE; PILATTI, L. A. **Estudo de caso:**

gerenciamento de resíduos sólidos industriais em uma indústria processadora de soja. XI Simpósio de Engenharia de Produção. **Anais...**Bauru: 2004

RACHON, G.; PEÑALOZA, W.; GIBBS, P. A. International Journal of Food Microbiology Inactivation of Salmonella , Listeria monocytogenes and Enterococcus faecium NRRL B-2354 in a selection of low moisture foods. **International Journal Food Microbiology**, v. 231, p. 16–25, 2016.

RANIERI, M. L. et al. Comparison of typing methods with a new procedure based on sequence characterization for Salmonella serovar prediction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1786–1797, 2013.

RAY, B.; BHUNIA, A. **Fundamental Food Microbiology**. [s.l.] CRC Press, 2013.

ROBERTS, T. A.; JARVIS, B. Predictive modelling of food safety with particular reference to Clostridium botulinum in model cured meat systems. In: ROBERTS, T. A.; SKINNER, F. A. (Eds.). . **Food Microbiology: advances and prospects**. New York: Academic Press, 1983. p. 85–95.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International Journal Food Microbiology**, v. 23, p. 241–264, 1994.

RÜCKERT, D. A. S. VON et al. Pontos críticos de controle de Salmonella spp. no abate de frangos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 61, n. 2, p. 326–330, 2009.

SANT'ANA, A. S. et al. Prevalence and counts of Salmonella spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1235–1237, 2011.

SANT'ANA, A. S. et al. Growth potential of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 52–58, 2012.

SANTILLANA FARAKOS, S. M.; FRANK, J. F.; SCHAFFNER, D. W. Modeling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of Salmonella in low-moisture foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 280–293, 2013.

SCHELIN, J. et al. Evaluation of pre-PCR processing approaches for enumeration of Salmonella enterica in naturally contaminated animal feed. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 167–178, 2014.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of Yeast Chromosome-Sized

- DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. **Cell**, v. 37, p. 67–75, 1984.
- SHAH, J. **Stress Response And Pathogenesis of Salmonella enterica serovar Typhimurium**. [s.l: s.n.].
- SIRSAT, S. A. et al. Effect of sublethal heat stress on Salmonella Typhimurium virulence. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 110, p. 813–822, 2011.
- SOARES, C. M. et al. **Salmonella spp detection in soybean meal samples from crushing plants in Brazil**. The EC Review Meeting and 4th General Meeting. **Anais...**Copenhagen: 2010
- SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of Salmonella enterica to environmental stresses. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 455–481, 2012.
- TAMMINGA, S. K. et al. Survival of Salmonella east bourne and Salmonella typhimurium in chocolate. **Epidemiology and Infection**, v. 76, p. 41–47, 1975.
- TORLAK, E.; SERT, D.; SERIN, P. Fate of Salmonella during sesame seeds roasting and storage of tahini. **International Journal Food Microbiology**, v. 163, p. 214–217, 2013.
- TORRES, G. J. et al. The prevalence of Salmonella enterica in Spanish feed mills and potential feed-related risk factors for contamination. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, n. 2–3, p. 81–87, 2011.
- USDA. **Cost of foodborne illness estimates for Salmonella (nontyphoidal)**. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses.aspx#48498>>.
- VANCAUWENBERGE, J. E.; BOTHAST, R. J.; KWOLEK, W. F. Thermal Inactivation of Eight Salmonella Serotypes on Dry Corn Flour. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 688–691, 1981.
- VILLA-ROJAS, R. et al. Thermal Inactivation of Salmonella Enteritidis PT 30 in Almond Kernels as Influenced by Water Activity. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 26–32, 2013.
- WALLS, I.; SCOTT, V. . N. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. **International Journal Food Microbiology**, v. 36, p. 97–102, 1997.
- WALTERS, M. J. The Travels of Antibiotic Resistance: Salmonella DT104. In: WALTERS, M. J. (Ed.). . **Seven Modern Plagues: and How We Are Causing Them**. 1. ed. Washington: Island Press, 2014. p. 53–82.

WEIBULL, W. A Statistical Distribution Function of Wide Applicability By. **Journal of Applied Mechanics**, v. 103, n. 51, p. 293–297, 1951.

WHO. Background document: The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever. **Communicable Disease Surveillance and Response Vaccines and Biologicals**, p. 2–48, 2003.

WIERUP, M.; HÄGGBLOM, P. An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of Salmonella contamination in pig production. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 15, 2010.

WIERUP, M.; KRISTOFFERSEN, T. Prevention of Salmonella contamination of finished soybean meal used for animal feed by a Norwegian production plant despite frequent Salmonella contamination of raw soy beans, 1994-2012. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, p. 41, 2014.

WILLIS, S. **The use of Soybean Meal and Full Fat Soybean Meal by the Animal Feed Industry**. 12th Australian Soybean Conference. **Anais...**Australia: 2003

YANG, S. et al. Investigations into Salmonella contamination in feed production chain in Karst rural areas of China. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–8, 2016.

ZOU, W. et al. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis profiles for identification of Salmonella serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3122–3126, 2010.