



## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS QUANTO AO SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE INTERESSE PARA CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS

Fabiana de Andrade **Farias**<sup>1</sup>; Miriam G. **Marquezini**<sup>2</sup>; Renata **Bromberg**<sup>3</sup>

Nº 22222

**RESUMO** – Com a atual demanda de produtividade da indústria de carnes, torna-se imprescindível a garantia da segurança microbiológica dos produtos em relação à presença de microrganismos patogênicos e de seus produtos metabólicos e, de impedir a presença de bactérias resistentes aos antibióticos utilizados durante a produção animal. Também, com o intuito de atender às exigências da legislação e dos padrões microbiológicos estabelecidos de modo a garantir que as carnes e produtos cárneos tenham qualidade e segurança, é cada vez mais necessária a incorporação de novas tecnologias nas diferentes etapas da cadeia produtiva. O uso de bacteriófagos ou fagos que são vírus que infectam células de bactérias específicas representa uma das mais promissoras tecnologias para a redução da incidência de bactérias patogênicas em produtos cárneos. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo demonstrar a detecção de fagos, a partir de amostras ambientais, em relação à sua atividade inibitória sobre as principais bactérias de interesse para a indústria de carnes, além de caracterizá-los quanto à sua sensibilidade a diferentes temperaturas. Foram isolados fagos com ação inibitória sobre *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*. Estes fagos apresentaram ação inibitória sobre estas bactérias tanto a 7°C como a 35°C. Em temperatura de congelamento observou-se a manutenção da viabilidade dos fagos no controle de *L. monocytogenes* e *E. coli*. Os fagos sofreram inativação quando submetidos a temperaturas elevadas. Assim, os fagos isolados podem desempenhar ação contra bactérias em diversas temperaturas de interesse para produtos cárneos, representando um potencial de aplicação futura ao setor cárneo.

**Palavras-chaves:** Bacteriófagos, Fagos, Antimicrobianos, Carnes, Isolamento, Inibição.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIT): Graduação em Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga-SP; fabiana.anfarias@gmail.com

2 Coorientador, Assistente de Pesquisa do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), Campinas-SP

3 Orientador, Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), Campinas-SP, renatab@ital.sp.gov.br



**ABSTRACT** – *With the current demand for productivity in the meat industry, it is essential to guarantee the microbiological safety of products in relation to the presence of pathogenic microorganisms and their metabolic products, and to prevent the presence of bacteria resistant to the antibiotics used during animal production. Also, in order to meet the requirements of legislation and microbiological standards established to ensure that meat and meat products have quality and safety, the incorporation of new technologies in the different stages of the production chain is increasingly necessary. The use of bacteriophages or phages, which are viruses that infect cells of specific bacteria, represents one of the most promising technologies for reducing the incidence of pathogenic bacteria in meat products. In this context, the present study aimed to demonstrate the detection of phages, from environmental samples, in relation to their inhibitory activity on the main bacteria of interest to the meat industry, in addition to characterizing them in terms of their sensitivity to different temperatures. Phages with inhibitory action on Escherichia coli, Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes were isolated. These phages showed inhibitory action on these bacteria both at 7°C and 35°C. At freezing temperature, maintenance of phage viability was observed in the control of L. monocytogenes and E. coli. Phages were inactivated when subjected to elevated temperatures. Thus, the isolated phages can act against bacteria at different temperatures of interest for meat products, representing a potential for future application in the meat sector.*

**Keywords:** Bacteriophages, Phages, Antimicrobials, Meat, Isolation, Inhibition.

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria de carnes tem papel relevante na economia do país devido à comercialização de seus produtos cárneos em todas as regiões do território brasileiro e também, pelo seu alto índice de exportação (XIMENES; SOARES, 2021). Dessa maneira, com o intuito de atender às exigências da legislação e dos padrões microbiológicos estabelecidos e, para garantir que os produtos tenham qualidade e segurança, é cada vez mais necessária a incorporação de novas tecnologias para complementar e garantir a qualidade das carnes e dos produtos cárneos nas diferentes etapas da cadeia produtiva (HENCHION et al., 2014; DAVID; GUIVANT, 2020).

O aumento da população humana estimulou uma expansão da produção de alimentos de origem animal sem grandes modificações das unidades de área já utilizadas. Com isso, com o intuito de melhorar a produção pecuária, os produtores fazem uso de substâncias que proporcionam o melhoramento do rebanho, como a utilização de anabolizantes e de vitaminas com objetivo de ganho de peso e aumento da altura e comprimento do animal, assim como de antibióticos usados para o



controle sanitário (FAJARDO-ZAPATA et al., 2011). Porém, conforme Peraza-Mercado (2018) descreveu, a maior parte dos produtos utilizados para o melhoramento da produção do setor cárneo acarreta o acúmulo de resíduos nos alimentos, por meio do ingrediente ativo ou de seus metabólitos. Dessa maneira, o emprego desses produtos de forma indiscriminada e excessiva ocasiona grandes riscos à saúde dos consumidores, principalmente em relação aos antibióticos pois, estes causam hipersensibilidade às demais drogas, em especial as penicilinas, promovendo resistência microbiana que se prolonga por toda a cadeia produtiva (PERAZA-MERCADO, 2018).

Nesse contexto, a contaminação de produtos de origem animal por microrganismos deteriorantes e patogênicos é um fator de extrema preocupação para a indústria de carnes, já que ocasiona perdas econômicas, descaracterização da imagem da empresa, perda na confiança de seus produtos, além de doenças graves que podem desencadear surtos alimentares, entre outros inconvenientes (SOFOS, 2014; CARVALHAIS, 2015). As contaminações dos produtos cárneos ocorrem por meio da presença de microrganismos pertencentes à microbiota natural dos animais destinados ao consumo, os quais podem ser encontrados no trato digestório, faringe, narinas, cavidade bucal e tecido linfático. Os microrganismos patogênicos ocasionam contaminação das carcaças durante o processo de abate, porcionamento, armazenamento e transporte até o consumidor final devido às condições de higiene do ambiente, dos manipuladores, dos utensílios e dos equipamentos usados durante estas etapas do processo (MATSUBARA, 2005). As principais bactérias patogênicas de interesse para carnes e produtos cárneos são *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (GOMIDES; RIBEIRO, 2021).

Diante disso, pesquisas que contribuam para o desenvolvimento de técnicas para o controle de bactérias em carnes e produtos cárneos são de grande relevância para a segurança e a qualidade desses alimentos (SOFOS, 2014). É imprescindível a garantia da segurança dos produtos cárneos em relação aos aspectos microbiológicos e toxicológicos, quanto à presença de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos e pela redução de resíduos químicos prejudiciais ao organismo humano. Assim, faz-se necessária a busca de novas tecnologias que proporcionem melhorias para a indústria da carne, sendo uma das mais promissoras a utilização de bacteriófagos ou fagos, que por sua vez, apresentam propriedades específicas para o hospedeiro bacteriano, se replicam na presença deste, promovem a rápida eliminação de bactérias, são estáveis em alimentos, não são nocivos a organismos eucariotos e se encontram em diversos ambientes e alimentos (KENNEDY et al., 1986). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi realizar o isolamento de fagos com ação inibitória sobre as principais bactérias patogênicas de interesse para a indústria da carne e também, caracterizá-los quanto à sua sensibilidade, quando expostos a diferentes temperaturas usualmente empregadas em carnes e produtos cárneos.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismos e condições de cultivo

As culturas bacterianas selecionadas para o estudo foram fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de forma liofilizada, mantidas e reativadas nas condições descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Culturas e condições de manutenção e ativação.

Culturas	Manutenção	Ativação
<i>E. coli</i> ATCC 11229	TSB+1,5% Glicerol -82°C	TSB 35°C / 24 h
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	TSB+1,5% Glicerol -82°C	TSB 35°C / 24 h
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	TSB+YE+1,5% Glicerol -82°C	TSB+YE 30°C / 24 h
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	TSB+1,5% Glicerol -82°C	TSB 35°C / 24 h
<i>Staph. aureus</i> ATCC 12600	BHI+1,5% Glicerol -82°C	BHI 35°C / 24 h

ATCC: American Type Culture Collection;

TSB: caldo Triptona de Soja;

TSB+YE: caldo Triptona de Soja suplementado com 0,3% de extrato de levedura;

BHI: caldo Infusão Cérebro Coração.

### 2.2. Amostras

A Tabela 2 apresenta as amostras de ambiente analisadas para o isolamento de fagos, as quais foram coletadas na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos FZEA/USP, campus Pirassununga e no Itai, entre os meses de setembro de 2021 e abril de 2022. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos quando em estado sólido e, em tubos Falcon quando em estado líquido e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Carnes do CTC/Itai para execução das análises.

**Tabela 2.** Amostras coletadas para os testes de isolamento de fagos.

CÓDIGO	AMOSTRAS
A1	esgoto do curral de vacas leiteiras – FZEA/USP
A2	solo com fezes do curral de equinos – FZEA/USP
A3	solo do curral de vacas leiteiras – FZEA/USP
A4	solo de lagoa – FZEA/USP
A5	água de lago artificial – FZEA/USP
A6	solo com fezes do curral de vacas leiteiras – FZEA/USP
A7	solo do curral de búfalos – FZEA/USP
A8	esgoto de abatedouro de gado de corte – FZEA/USP
A9	solo do curral de búfalos – FZEA/USP
A10	água de rede de tratamento - Itai
A11	esgoto de rede de tratamento - Itai
A12	cama de aviário – FZEA/USP
A13	esgoto de abatedouro de bovinos – FZEA/USP
A14	solo de curral de vacas leiteiras – FZEA/USP
A15	solo próxima ao curral das vacas leiteiras – FZEA/USP
A16	solo de lagoa – FZEA/USP
A17	esterco de vacas leiteiras – FZEA/USP

### 2.3. Isolamento de fagos

Para o isolamento dos fagos, foi adotada a metodologia descrita por Gregoracci (2006) com modificações. Para tanto, adicionaram-se em frasco autoclavável volumes de amostras e de tampão SM (20 mg/L TrisHCl, 10 mg/L MgSO<sub>4</sub>, 10 mg/L CaCl<sub>2</sub>, 100 mg/L NaCl, pH 7,5, SAMBROOK & RUSSELL, 2001) na proporção 1:1, de forma a obter-se volume final aproximado de 100 mL. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em agitador magnético e, em cada frasco foram adicionados de forma pausada 5,8 g/100mL de NaCl, com a finalidade de dissociar os fagos dos restos celulares, seguindo-se de agitação em agitador magnético por 1,5 h para a completa dissolução do sal.

Os conteúdos dos frascos autoclaváveis foram transferidos para quatro tubos Falcon, seguido de dois ciclos de centrifugação a 7.500 rpm por 15 min para a total decantação de sólidos em suspensão. O sobrenadante foi transferido para outros tubos Falcon, nos quais foi adicionado polietilenoglicol (PEG, peso molecular 8.000) a 10% (m/v), seguido de homogeneização em vórtex por 2 min e incubação a 4°C por 12 h. Conforme descrito por Torri et al. (2022), o PEG pode ser considerado um agente concentrador de vírus, pois irá ocasionar uma precipitação das células de bactérias para que o sobrenadante apresente uma concentração maior de fagos.

Na sequência, os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm por 20 min, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 10 mL de tampão SM e adicionado de 2 mL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e mantidos a 4°C por 72 h com a tampa semiaberta para evaporação completa do clorofórmio., a qual foi verificada por meio da presença de odor característico remanescente. Os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm por 10 min e o sobrenadante contendo o extrato de fago foi transferido para tubos Falcon estéreis e, armazenados a 4°C envoltos em papel alumínio.

Para a indução da infecção bacteriofágica, ou seja, a interação entre o fago e a bactéria, 200 µL das culturas ativas de *E. coli* O157:H7, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Staph. aureus* e *S. typhimurium*, foram transferidos para microtubos estéreis de 2 mL. A esses tubos foram adicionados 300 µL do extrato de fago seguindo-se de incubação a 30°C, no caso de *L. monocytogenes* e a 35°C para as demais culturas por aproximadamente 1 h. Após esse período, foram fundidos tubos contendo 3 mL de meio de cultura semissólido (0,7% ágar), os quais foram mantidos em banho em temperatura de 44°C. Em seguida, a suspensão da bactéria e a do extrato de fago foram transferidos para os tubos de cultura semissólidos, gentilmente homogeneizados e distribuídos uniformemente pela superfície de placas de Petri contendo os meios de culturas TSA, BHI ou TSA+YE, de acordo com a cultura de bactéria testada. Após a solidificação dos meios, as placas foram incubadas na temperatura ótima por 24 h e a formação de placas de lise foi avaliada (KESIK-SZELOCH et al., 2013).

## 2.4. Propagação de fagos

As culturas bacterianas foram ativadas de acordo com o descrito no item 2.1. e, no dia seguinte 0,5 mL de cada cultura foi transferido para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura adequado para o cultivo bacteriano. Os tubos foram incubados a 30°C, no caso de *L. monocytogenes* e a 35°C para as demais culturas por 24 h. Em seguida, com o auxílio de alça de platina esterilizada foram coletados 3 halos de fagos das placas de lise nos quais foram adicionados 5 mL de meio de cultura adequado. Após esse período, foram adicionadas algumas gotas de clorofórmio e, foi realizada incubação por 15 min. De modo a dissociar os fagos dos restos celulares, foi adicionado cloreto de sódio (NaCl) até a concentração de 1 M, seguido de repouso por a 4°C por 1 h. Transcorrido o tempo de repouso, as culturas foram centrifugadas a 5.300 rpm por 20 min, sendo o sobrenadante transferido para um tubo Falcon e armazenado a 4°C para conservação dos fagos isolados.

## 2.5. Avaliação da sensibilidade de fagos a diferentes temperaturas

Verificou-se o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento e de tratamento térmico sobre o potencial antimicrobiano dos fagos isolados. Com base nisso, padronizou-se a concentração inicial das culturas ativas de *E. coli*, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* a partir da medida da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 625 nm. Após estas atingirem DO de 0,08 a 0,10, correspondendo a concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, as culturas foram diluídas seriadamente e a diluição de  $10^3$  foi selecionada para os testes.

Para a avaliação da atividade inibitória dos fagos foram usadas microplacas estéreis de 96, os quais foram inoculados 50 µL da cultura de bactéria, adicionados de 50 µL de meio de cultura específico e de 50 µL de extrato de fago. Culturas bacterianas sem adição dos extratos de fagos foram utilizadas como controle positivo dos testes. O controle negativo foi preparado a partir do meio de cultura e o extrato de fago. Após o preparo das microplacas estas foram incubadas nas temperaturas e tempos indicados de cada tratamento. Transcorrido o período de incubação, foi realizada leitura de DO a 620 nm para avaliação da inibição bacteriana. Foram testados os seguintes tratamentos:

- Incubação das microplacas nas temperaturas de 7°C e 35°C por 24 h.
- Manutenção a -6°C por 7 dias de volumes de 100 µL de cada extrato de fago em microtubos, seguida de descongelamento em temperatura ambiente e incubação em microplaca a 35°C por 24 h. O extrato de fago para o controle positivo foi mantido a 4°C.



- Tratamento térmico a 62°C por 3 min e 67°C por 1,5 h em banho maria a seco de volumes de 100 µL de cada extrato de fago em microtubos, seguiu-se com incubação em microplaca a 35°C por 24 h. O extrato de fago para o controle positivo foi mantido a 4°C.

Os resultados foram obtidos a partir do cálculo da diferença entre os valores de DO do controle positivo e os valores de DO de inibição entre os fagos e bactérias. Com base nos cálculos realizados das leituras de DO, foi considerado que quanto mais próximo de zero os valores obtidos maior crescimento microbiano ocorreu após incubação em presença dos fagos, indicando que estes não foram eficientes para o controle do crescimento das bactérias.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Isolamento de fagos

A ação inibitória de fagos pôde ser evidenciada por meio da formação de zonas claras nas placas inoculadas com *E. coli*, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* (Figura 1). Em relação ao *Staph. aureus* e *S. typhimurium*, não foram isolados fagos com ação inibitória sobre estas bactérias a partir das amostras testadas.

Os fagos isolados receberam as codificações A4, A7, A14, A15 e A17 e foram detectados em amostras coletadas no ambiente de criação de animais e de água de lagoa. Os fagos apresentaram ação inibitória sobre as seguintes bactérias:

- *L. monocytogenes* - A4, A7, A14;
- *E. coli* - A4, A7, A14, A15, A17;
- *E. coli* O157:H7 - A4, A7, A14, A15, A17.

Conforme Nikolich & Filippov (2020) os fagos infectam seus hospedeiros bacterianos de forma específica, sendo mais comum os fagos infectarem apenas uma espécie de bactéria ou um subgrupo dentro de uma mesma espécie bacteriana. Diante disso, os fagos A4, A7 e A14 apresentaram grande diferencial em relação aos demais fagos, apresentando ação inibitória sobre as três culturas bacterianas avaliadas. Por outro lado, os fagos A15 e A17 apresentaram especificidade sobre *E. coli* e *E. coli* O157:H7.

#### 3.2. Avaliação da sensibilidade de fagos a diferentes temperaturas

Constatou-se que o fago A14 apresentou ação inibitória intensa para o controle de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 a 35°C, pois a DO apresentou valores reduzidos de crescimento bacteriano, porém a mesma intensidade não foi observada para a *E. coli*. Os fagos A15 e A17 também apresentaram ação inibitória considerável para a redução do crescimento de *E. coli* O157:H7 a 35°C, sendo que o A17 também apresentou ação sobre *E. coli*.

Na temperatura de 7°C foi observada a ação inibitória dos fagos A14, A15 e A17 variando entre moderada e intensa sobre todas as bactérias testadas. Porém deve-se considerar o fato de que a essa temperatura as bactérias normalmente apresentam atividade metabólica reduzida e, com isso, podem ter o crescimento retardado influenciando a eficiência do fago. Assim, a inibição pode ter ocorrido pelo fato dos fagos terem lisado somente as células bacterianas que já estavam presentes no meio e, não necessariamente terem promovido o controle do crescimento destas bactérias.

A exposição dos fagos a temperatura de congelamento indicou que o fago A14 manteve viabilidade mostrada por meio de sua eficiência no controle inibitório de *L. monocytogenes* e *E. coli*, o que não ocorreu com a mesma intensidade para *E. coli* O157:H7. Conforme estudos de Jepson & March (2004) os fagos são resistentes a repetidos procedimentos de congelamento e descongelamento sem provocar alterações que comprometam sua estabilidade.

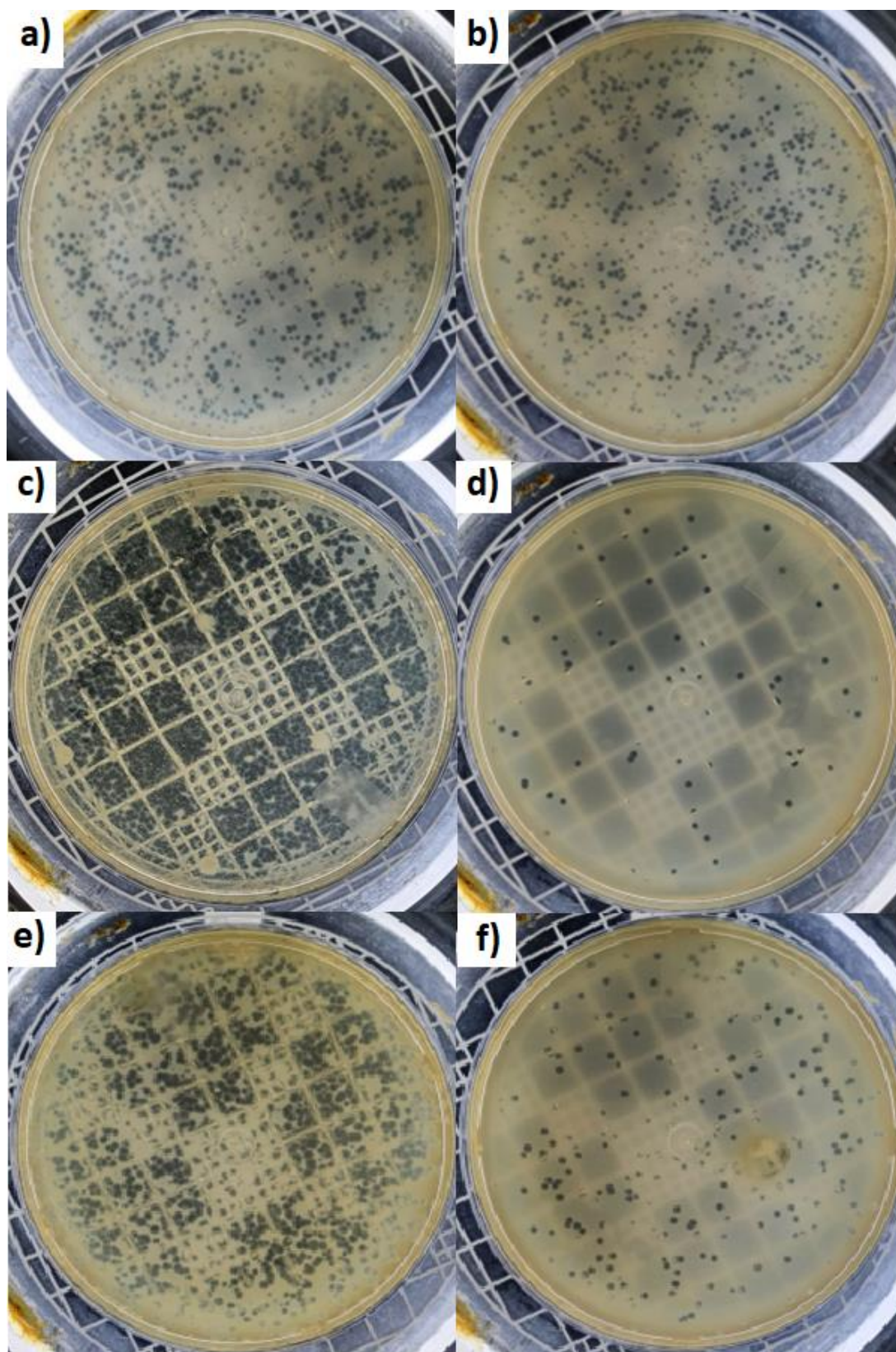
Já em relação ao tratamento térmico, foi observado que nas condições testadas não houve ação inibitória dos fagos para o controle bacteriano, ou seja, houve inativação dos fagos quando submetidos aos tratamentos térmicos aplicados. Essa observação é de extrema importância para a aplicação dos fagos em produtos cárneos, já que muitos produtos são processados em condições equivalentes. A resistência térmica dos fagos pode ser intensificada quando os mesmos estão em interação com o alimento ao invés dos meios de cultura, como o usado no presente estudo. Alguns autores (Atamer et al., 2009) mostraram a resistência térmica de fagos no tratamento térmico de alimentos. A indução bacteriofágica de *Lactococcus lactis* em amostras de leite desnatado, mostraram que 41% dos fagos sobreviveram a tratamento térmico a 80°C por 5 min, sendo que a maioria dos fagos foi completamente inativada a temperatura de 95°C por 5 min.

**Tabela 3.** Ação inibitória (DO) de fagos submetidos a diferentes tratamentos térmicos.

Temperatura X Tempo	Bactéria x Fagos (DO)					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7			<i>E. coli</i>	
	A14	A14	A15	A17	A14	A17
-6°C / 7 dias	0.693	0.108	-	-	0.499	-
7°C / 24 h	0.226	0.301	0.624	0.635	0.389	0.241
35°C / 24 h	1.161	0.794	0.970	0.858	0.108	0.227
62°C / 3 min	-0.037	-0.065	-	-	-0.042	-
67°C / 1,5 h	-0.074	-0.134	-	-	-0.085	-

(-) condição não avaliada





**Figura 1.** Ação inibitória de fagos isolados sobre bactérias de importância para carnes: **a)** fago A4 e *E. coli*; **b)** fago A7 e *E. coli*; **c)** fago A4 e *E. coli* O157:H7; **d)** fago A7 e *E. coli* O157:H7; **e)** fago A4 e *L. monocytogenes*; **f)** fago A7 e *L. monocytogenes*.



#### 4. CONCLUSÃO

Isolaram-se fagos com forte potencial inibitório sobre *E. coli*, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*, porém não foi possível obter-se fagos com ação sobre as demais culturas testadas (*Staph. aureus* e *S. typhimurium*). Quanto à sensibilidade dos fagos em diferentes temperaturas, verificou-se a ação inibitória dos fagos testados a 7°C e 35°C sobre *E. coli*, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*. Na temperatura de congelamento observou-se que os fagos mantiveram sua viabilidade, constatada por meio de sua eficiência no controle de *L. monocytogenes* e *E. coli*. Verificou-se a ocorrência da inativação dos fagos quando submetidos aos tratamentos térmicos aplicados, em decorrência de sua sensibilidade a altas temperaturas. Demonstrou-se que os fagos isolados podem ser eficientes para o controle do crescimento de bactérias de interesse para a indústria de carnes e, que estes podem desempenhar esta ação em diversas condições de temperaturas nas quais os produtos cárneos são expostos.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa concedida, ao CTC/Ital pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa e à Dra. Luciana Maria de Hollanda pela colaboração científica.

#### 6. REFERÊNCIAS

ATAMER, Z.; DIETRICH, D.; MÜLLER-MERBACH, M.; NEVE, H.; HELLER, K. J.; HINRICHS, J. Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. **International Dairy Journal**, v. 19, ed. 4, p. 228-235, 2009.

CARVALHAIS, J. F. **Eficiência do bacteriófago LiSIGC no controle de *Listeria monocytogenes***. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, MG.

DAVID, M. L.; GUIVANT, J. S. Food Identity and Quality Standards: An Analysis of its transformations in Brazil. **Revista de Ciências Sociais**, v. 25, n. 1, p. 247, 2020.

FAJARDO-ZAPATA, Á. L.; MENDEZ-CASALLAS, F. J.; MOLINA, L. H. Residues of anabolic drugs in meat intended for human consumption. **Universitas Scientiarum**, v. 16, n. 1, p. 77-91, 2011.

GOMIDES, E. T.; RIBEIRO, L. F. Determinação de microrganismos deteriorantes em linguiça calabresa, antes e após o cozimento. **GETEC - Gestão, Tecnologia e Ciências**, v. 10, n. 29, p. 122-137, 2021. Disponível em: < <http://www.fucamp.edu.br/editora/index.php/getec/article/view/2408>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

GREGORACCI, G. B. **Levantamento de bacteriófagos líticos: isolamento e caracterização de vírus provenientes de esgoto comum com potencial aplicação antimicrobiana**. 2006. 101 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, SP.

HENCHION, M.; MCCARTHY, M.; RESCONI, V. C.; TROY, D. Meat consumption: Trends and quality matters.



**Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 561–568, 2014.

JEPSON, C. D.; MARCH, J. B. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. **Vaccine**, v. 22, ed. 23, p. 2413-2419, 2004.

KENNEDY, J. E.; WEI, C. I.; OBLINGER, J. L. Distribution of coliphages in various foods. **Journal of Food Protection**, v. 49, n. 12, p. 944–951, 1986.

KESIK-SZELOCH, A.; DRULIS-KAWA, Z.; WEBER-DABROWSKA, B.; KASSNER, J.; MAJKOWSKA-SKROBEK, G.; AUGUSTYNIAK, D.; ŁUSIAK-SZELACHOWSKA, M.; ŻACZEK, M.; GÓRSKI, A.; KROPINSKI, A. M. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Virology Journal**, v. 10, p. 1-12, 2013.

MATSUBARA, E.N. **Condição higiênico- sanitária de meias carcaças de suínos após o abate e depois do término do resfriamento e análise da utilização de Lista de Verificação para avaliar boas práticas de abate de suínos**. 2005. 154 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, SP.

NIKOLICH, M. P.; FILIPPOV, A. A. Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 135, 2020.

PERAZA-MERCADO, G. Impacts on the health of the population by consumption of meat with traces of anabolic steroids and antibiotics. In: GATICA-COLIMA, A.; PLENGE-TELLECHEA, F. **Species harmful to humans and the environment**. Juárez, Chihuahua, México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, cap. 5, p. 91-107, 2018.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**, ed. 3, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SOFOS, J. N. Meat and Meat Products. In: MOTARJEMI, Y.; LELIEVELD, H. **Food Safety Management**. Academic Press, cap. 6, p. 119–162, 2014.

TORII, S.; OISHI, W.; ZHU, Y.; THAKALI, O.; MALLA, B.; YU, Z.; ZHAO, B.; ARAKAWA, C.; KITAJIMA, M.; HATA, A.; IHARA, M.; KYUWA, S.; SANO, D.; HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H. Comparison of five polyethylene glycol precipitation procedures for the RT-qPCR based recovery of murine hepatitis virus, bacteriophage phi6, and pepper mild mottle virus as a surrogate for SARS-CoV-2 from wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 807, part 2, 2022.

XIMENES, L. F.; SOARES, K. R. Carne Bovina. **Caderno Setorial ETENE** (Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste). Banco do Nordeste, ano 6, n. 188. 2021. Disponível em: [https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1006/1/2021\\_CDS\\_188.pdf](https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1006/1/2021_CDS_188.pdf). Acesso em: 10 jan. 2022.