

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS  
ISOLADAS DE LEITE CRU DE OVELHA**

MARIA RITA SOUTO DIAS

Porto Alegre  
1º Semestre  
2015

MARIA RITA SOUTO DIAS

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS  
ISOLADAS DE LEITE CRU DE OVELHA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Comissão de Graduação da  
Faculdade de Veterinária como requisito  
parcial para obtenção da Graduação em  
Medicina Veterinária

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Amanda de Souza da  
Motta

Porto Alegre

1º Semestre

2015

*A Vovó Lulu e Tia Myrta, pelos  
exemplos que foram e por me darem  
força para seguir todos os dias.  
Saudades eternas...*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo dom da vida e pela possibilidade de realizar mais um objetivo.

Ao meu pai, José Galdino, por me mostrar a profissão mais linda de todas e possibilitar que eu realizasse esse sonho.

À minha mãe, Luciana, pelo incentivo incansável de sempre.

Aos meus irmãos, José Armando, Maria Paula e José Paulo, por existirem e estarem sempre ao meu lado.

Ao Diego, pelo amor, paciência e confiança.

Ao meu avô Paulo Souto, pelo exemplo e por despertar em mim a vontade de ser cada vez melhor, pelo orgulho que transborda de seus olhos a cada conquista minha.

Aos meus avós Rita e José Dias, exemplos de integridade, força e dedicação.

A toda minha família, por ser a melhor do mundo.

À Amanda, pela amizade, pelas oportunidades e pela melhor orientação que eu poderia receber.

Aos colegas da Universidade Federal de Pelotas que se tornaram amigos para sempre.

Aos colegas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me acolherem e fazerem os meus dias mais felizes.

Aos professores, pela transmissão dos conhecimentos e experiências.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE GRAFICOS .....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Ovinocultura .....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Panorama mundial .....	12
2.1.2 Brasil .....	14
2.1.3 Ovinocultura leiteira.....	15
2.1.3.1 Panorama mundial .....	15
2.1.3.2 Raças leiteiras.....	18
<b>2.2 Leite de ovelha .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Composição .....	19
2.2.1.1 Minerais.....	20
2.2.1.2 Proteínas.....	21
2.2.1.3 Lipídeos.....	22
2.2.1.4 Lactose.....	23
2.2.2 Derivados lácteos.....	24
2.2.2.1 Queijos .....	24
2.2.2.2 Iogurtes .....	27
2.2.3 Microbiologia .....	28
<b>2.3 Bactérias lácticas .....</b>	<b>29</b>
2.3.1 Conceito .....	29
2.3.2 Atividade antimicrobiana .....	30
2.3.3 Atividade proteolítica .....	31
2.3.4 Produção de diacetil.....	33
2.3.5 Produção de gelatinase.....	33

2.3.6	Produção de exopolissacarídeos .....	34
2.3.7	Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção das amostras.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Caracterização preliminar.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3</b>	<b>Avaliação das propriedades tecnológicas .....</b>	<b>36</b>
3.3.1	Atividade antimicrobiana .....	36
3.3.2	Perfil de acidificação.....	37
3.3.3	Atividade proteolítica .....	37
3.3.4	Produção de diacetil.....	37
3.3.5	Produção de Exopolissacarídeo.....	38
3.3.6	Avaliação da segurança (antibiograma e prova da gelatinase) .....	38
3.3.7	Coexistência entre os isolados.....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização preliminar.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação das propriedades tecnológicas .....</b>	<b>41</b>
4.2.1	Atividade antimicrobiana .....	41
4.2.2	Perfil de acidificação.....	43
4.2.5	Produção de Exopolissacarídeo .....	46
4.2.6	Avaliação da segurança .....	47
4.2.7	Coexistência entre os isolados.....	48
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução da proteólise em queijos.....	32
Figura 2 - Formação de halos de inibição das BAL frente a micro-organismos indicadores .....	42
Figura 3 - Resultado da acidificação do meio pelo método da fita de pH.....	44
Figura 4 - Atividade proteolítica das BAL .....	45
Figura 5 - Formação de anel vermelho indicando produção de diacetil .....	46
Figura 6 - Produção de exopolissacarídeo pelas BAL.....	46
Figura 7 - Halos de inibição das BAL frente aos antimicrobianos .....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção mundial de leite fresco e integral (toneladas).....	16
Tabela 2 - Estimativa do processamento brasileiro de leite ovino em 2007.....	17
Tabela 3 - Composição físico-química do leite de diferentes espécies.....	20
Tabela 4 - Comparação entre o leite de ovelha e de vaca em relação as necessidades humanas diárias de minerais.....	21
Tabela 5 - Principais queijos de ovelha com denominação de origem.....	25
Tabela 6 - Características físico-químicas de queijo minas curado de leite de ovelha .....	26
Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos de queijo tipo Pecorino Toscano fresco (PT0), com 90 (PT90), 180 (PT180), 270 (PT270) dias de maturação, Feta (FT) e Labneh (LB) produzidos com leite de ovelha.....	26
Tabela 8 - Caracterização físico-química do iogurte do leite de ovelha.....	28
Tabela 9 - Características das BAL isoladas neste trabalho.....	40
Tabela 10 - Diâmetro dos halos de inibição das BAL frente às culturas indicadoras.... .....	42
Tabela 11 - Perfil de acidificação das BAL em 0, 6, 12, 24 e 48 horas.....	43
Tabela 12 - Diâmetro dos halos de proteólise produzidos pelas BAL.....	45
Tabela 13 - Avaliação do comportamento das BAL frente aos antimicrobianos.....	48
Tabela 14 - Coexistência entre os isolados.....	49



## LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1 - Distribuição de ovinos no mundo.....	13
Gráfico 2 - Produção de leite ovino por continente em 2013.....	16

## RESUMO

O leite ovino é uma matéria-prima ainda pouco estudada no Brasil, pois a ovinocultura leiteira é uma atividade recente no país. As bactérias ácido lácticas, (BAL) encontradas em muitos alimentos, são responsáveis pela fermentação e contribuem para as características sensoriais e organolépticas de muitos produtos, além de serem benéficas para o consumidor. Este trabalho buscou isolar BAL de leite ovino e estudar suas principais atividades funcionais para uma possível utilização em alimentos. Foram isoladas 24 culturas que passaram por uma seleção inicial de coloração de Gram e prova da catalase. Os cinco isolados que se mostraram Gram-positivos e catalase negativos foram encaminhados para uma caracterização de gênero através da avaliação de formação de tetrada, produção de CO<sub>2</sub> a partir da glicose, crescimento a 10 e 45°C, crescimento em pH 4,4 e 9,6 e crescimento em NaCl 6,5 e 18%. Três culturas foram identificadas como sendo do gênero *Enterococcus* e duas do gênero *Lactobacillus*. Essas culturas seguiram para as análises de avaliação da atividade antimicrobiana, atividade proteolítica, perfil de acidificação, produção de exopolissacarídeos, produção de diacetil, perfil de resistência aos antibióticos, produção de gelatinase e teste de coexistência. Para avaliar a atividade antimicrobiana, as culturas foram confrontadas com *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Foi observado que 100% das culturas demonstraram atividade contra pelo menos um desses micro-organismos indicadores. Duas das culturas foram capazes de inibir todas as culturas indicadoras testadas. Os cinco isolados mostraram a mesma capacidade de acidificação do meio para pH 4,5 a partir de seis horas de incubação, assim como todos produziram exopolissacarídeos e proteólise. A produção de diacetil ocorreu em apenas duas culturas. Quanto ao perfil de resistência aos antibióticos, 100% das culturas foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados, assim como todas foram incapazes de produzir a enzima gelatinase, duas características de importância para a segurança de sua utilização. As bactérias lácticas avaliadas nesse trabalho não inibiram o crescimento umas das outras, podendo ser utilizadas concomitantemente de acordo com as características de interesse. Os resultados gerados demonstram um potencial interessante dessas culturas para serem aplicadas em alimentos, no que diz respeito as suas atividades antimicrobianas e propriedades tecnológicas avaliadas.

Palavras-chave: leite ovino, bactérias lácticas, propriedades tecnológicas

## ABSTRACT

The sheep milk is not well known raw material in Brazil, because the dairy sheep industry is a recent activity in the country. The lactic acid bacteria (LAB) found in many foods are responsible for fermentation and contribute to the sensory and organoleptic characteristics of many products, besides being beneficial to the consumer. This study aimed to isolate milk BAL sheep and study its main functional activities for possible use in food. Twenty-four cultures were isolated and have passed through an initial selection of Gram stain and catalase test. The five isolates that showed Gram positive and catalase negative were directed to a characterization gender by evaluating tetrad formation of CO<sub>2</sub> production from glucose, up to 10 to 45 °C, growth pH 4.4 and 9.6 and growth in 6.5 and 18% NaCl. Three cultures were identified as the genus *Enterococcus* and two of the genus *Lactobacillus*. These cultures followed for the analyzes to assess the antimicrobial activity, proteolytic activity, acidification profile, exopolysaccharide production, diacetyl production, antibiotic resistance profile, gelatinase production and coexistence test. To evaluate the antimicrobial activity, the cultures were tested with *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. It was observed that 100% of the cultures demonstrated activity against at least one such micro-organisms indicators. Two of the cultures were capable of inhibiting all tested cultures indicator. The five isolates showed the same capacity acidification of the medium to pH 4.5 from six hours of incubation, as well as th exopolysaccharides was produced and proteolysis was observed. The production of diacetyl occurred in only two cultures. As for the resistance profile to antibiotics, 100% of the cultures were susceptible to most antimicrobials tested, and all were unable to produce the enzyme gelatinase, two features of importance to the safety of its use. Lactic acid bacteria assessed in this study did not inhibit the growth of one another, may be used concomitantly according to the characteristics of interest. The generated results show an interesting potential of these cultures to be applied in food, as regards their antimicrobial activities and technological properties.

Keywords: sheep milk, lactic acid bacteria, technological properties

## 1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura de leite é uma atividade recente no Brasil. A maior área produtora de leite e queijo ovino está localizada no entorno do Mar Mediterrâneo (BOYAZOGLU, 2001). O Brasil processa em torno de 509.000 litros de leite ovino por ano, apenas 0,0019% do total de leite produzido no país (SELAIVE, 2014).

Embora o custo de produção do leite ovino ovelha seja mais alto, o retorno econômico com a produção de leite de ovelha é quase o dobro do retorno com a produção de lã e carne (HAENLEIN, 2000). O leite fluido praticamente não é utilizado, sendo mais valorizado para a produção de derivados em função do seu alto rendimento (BENCINI, 2001), pois para produzir 1 kg de queijo de ovelha é necessária metade da quantidade de leite usada para fabricar 1 kg de queijo de vaca. Como a quase totalidade do leite de ovelha é transformado em queijo e outros derivados, a qualidade do leite está diretamente relacionada ao seu rendimento industrial, dependendo, principalmente, do tempo de coagulação, da taxa de formação e da consistência do coágulo. Essas propriedades são afetadas pela composição do leite, pela contagem de células somáticas e pelo próprio processamento industrial. Portanto, qualquer fator que afete a composição do leite, também afetará a produção e qualidade dos derivados lácteos (CAVALLI et al, 2008).

Existem poucos estudos a respeito da microbiota autóctone do leite ovino. A maioria dos trabalhos identificaram os gêneros de bactérias ácido lácticas (BAL) *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostc* como os mais prevalentes (CHANOS, 2011; ACURCIO, 2011; OKSUZTEPE, 2005; ABD EL AAL, 2008; ARIZCUN, 1997). As bactérias lácticas são cocos e bastonetes Gram positivos, catalase negativos, não esporulados, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos. São produtores de ácidos, conseguem se multiplicar em pHs baixos como 3,8 e crescem em uma faixa de temperatura que varia de 5 a 45°C (SALMINEN, 1993; FORSYTHE, 2013). Essas bactérias fazem parte da flora intestinal adquirida dos seres humanos e são encontradas em uma ampla variedade de alimentos como vegetais, vinhos, leite e carnes (FORSYTHE, 2013). Além disso, são responsáveis pela fermentação de uma grande variedade de produtos (MAGRO et al., 2000). Dentre as suas principais características está a capacidade de produzir

substâncias inibidoras do crescimento microbiano, principalmente pela produção de ácidos. Também são responsáveis pela produção de diversos outros compostos que possuem funções importantes em alimentos como ácido láctico, etanol, ácido acético, dióxido de carbono e ácido fórmico.

Portanto, este trabalho teve o objetivo de isolar bactérias lácticas de leite ovino e avaliar suas propriedades antimicrobianas contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e suas propriedades tecnológicas, como perfil de acidificação, atividade proteolítica, produção de diacetil, produção de exopolissacarídeos, perfil de resistência aos antibióticos, produção de gelatinase e a coexistência entre os isolados, visando produzir informações e descobrir novas culturas com potencial para serem utilizadas na fabricação de alimentos.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Ovinocultura**

#### **2.1.1 Panorama mundial**

A espécie ovina foi uma das primeiras a ser domesticada pelo homem, com relatos no Antigo Testamento, onde rebanhos faziam parte das civilizações das Planícies Mesopotâmicas (GRIEBLER, 2012; ZEN et al, 2014). Algumas razões levam a crer que o ovino doméstico tenha se originado do Muflon, originário da Europa e Ásia ou do Urial Asiático. Ambos são selvagens, com chifres, caudas curtas e o corpo coberto mais por pêlos do que por lã.

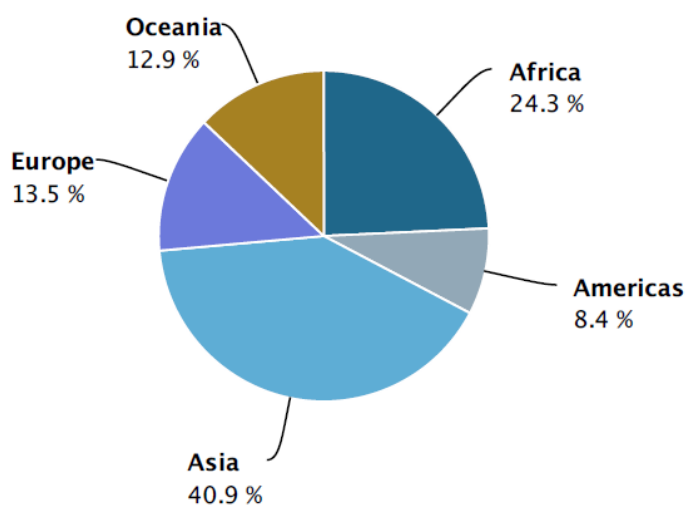
A migração dos animais domésticos e dos povos era dependente da utilização das pastagens naturais, sendo responsável pela mudança no número de ovinos nas diferentes regiões. Além disso, o ovino é um animal que ocupa ambientes impróprios

para a agricultura, como regiões montanhosas e semiáridas, o que contribui para a sua facilidade de adaptação a diferentes locais (OTTO DE SÁ, 2006?).

Essa espécie tem demonstrado sua capacidade de conversão de forragens em produtos de qualidade e essenciais para os seres humanos como lã, pele, carne e leite. Mas, em decorrência da crise da lã ocorrida nas décadas de 80 e 90, onde houve o advento da fibra sintética e conseqüente aumento no estoque internacional de lã, os sistemas de produção de ovinos começaram a focar principalmente na produção de carne e leite (GRIEBLER, 2012; ZEN et al, 2014).

A população de ovinos no mundo tem se mantido estável nos últimos 30 anos em cerca de 1 bilhão de animais. Cerca de 40% dos animais estão distribuídos entre os Estados Unidos da América e os países europeus. Mas alguns dos principais países produtores apresentaram crescimento negativo no número de animais em 2011, como Espanha, Itália e França. Em contrapartida, o Reino Unido, que possui a maior população de ovinos no grupo, contando com 38 milhões de cabeças, apresentou um crescimento de 0,8% em comparação a 2010. A Grécia, que conta com 14 milhões de cabeças, também aumentou seus estoques. A Turquia possui 29 milhões de cabeças e a Rússia conta com 22 milhões. Portanto, a Ásia, com um crescimento de 5,4% ao ano, e a região do Pacífico, detém metade do rebanho mundial de ovinos (Gráfico 1) (FAO, 2014).

Gráfico 1: Distribuição de ovinos no mundo



Fonte: FAO, 2014

No hemisfério Sul, a população de ovinos se concentra basicamente na Argentina, Uruguai, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia. Esses países importaram, nos séculos XVIII e XIX, animais da raça Merino, visando, principalmente, a utilização e comercialização da lã. Estes lugares foram favorecidos pela terra barata e abundante e pelas condições climáticas favoráveis. A Austrália foi, por muitos anos, a maior produtora de ovinos do mundo com 135 a 170 milhões de cabeças. Mas, em função do declínio da lã, sua produção vem diminuindo ao longo dos anos. A Nova Zelândia diversificou seu mercado focando na carne ovina e não apenas na lã dos animais importados da Austrália. Mas não sacrificou esse mercado, pois substituiu a lã fina do Merino por uma mais grossa muito utilizada em tapeçarias (OTTO DE SÁ, 2006?).

### 2.1.2 Brasil

No Brasil, o efetivo de ovinos apurado em 2011 foi de 17,662 milhões de cabeças, representando um aumento de 1,6% em relação ao número registrado em 2010. As regiões Norte e Sul do país apresentaram um aumento no rebanho ovino de 1,3% e 1,2%, respectivamente, devido aos incentivos dos governos regionais pela distribuição de matrizes para pequenos produtores de alguns municípios. A região Sudeste apresentou um decréscimo no número de ovinos de 1,7%. Também na região Centro-oeste foi observada uma diminuição no rebanho ovino de 4,6%, podendo ser atribuída à desativação de programas de incentivo (IBGE, 2011).

O maior efetivo de ovinos, em 2010, encontrava-se na Região Nordeste, contando com 56,7% do total nacional, tendo como finalidade a produção de carne e leite. A Região Sul representava 28,1% desse plantel, sendo o Rio Grande do Sul o Estado com o maior número de animais (IBGE, 2010). Em 2011, o Rio Grande do Sul possuía 22,6% do rebanho brasileiro, sendo o mais representativo em termos nacionais, contando principalmente com a produção de lã. Na sequência estavam Bahia, com 17,4%, e Ceará, com 12,1%. Além disso, a produção de lã no Estado apresentou aumento de 1,4% comparado ao ano de 2010, registrando 11,804 mil toneladas do produto (IBGE, 2011).

A produção brasileira de ovinos ainda não abastece o mercado interno com qualidade e eficiência devido, principalmente, à falta de oferta constante. Além disso, observa-se que a caprino e ovinocultura são atividades secundárias à bovinocultura. Sendo assim, se torna essencial a importação de carne ovina de outros países como o Uruguai, que é responsável por quase a totalidade da carne importada pelo Brasil (ZEN et al, 2014).

### 2.1.3 Ovinocultura leiteira

#### 2.1.3.1 Panorama mundial

O rebanho ovino situa-se em 4º lugar entre as espécies produtoras de leite do mundo, com produção de 9.246.480 toneladas de leite em 2009, contra 578.450.488 toneladas de leite de vaca, e aproximadamente 1.077.276.081 de cabeças (FAOSTAT, 2011). Em 2011, a produção de leite de ovelha foi de aproximadamente 9,3 milhões de toneladas, representando cerca de 1,27% do total de leite produzido no mundo, e a produção de queijo ovino foi de 644,2 mil toneladas (FAO, 2012). O leite de ovelha corresponde a cerca de 1,4% da produção de leite das principais espécies produtoras (Tabela 1) (FAO, 2009).

No entorno do Mar Mediterrâneo está a maior e mais tradicional área produtora de leite e queijos de ovelhas, sendo que aproximadamente dois terços de todo o leite ovino do mundo é produzido ali. Nessa região, 60% das ovelhas são ordenhadas e cerca de 95% de seu leite é transformado em derivados lácteos. A carne dos animais é considerada subproduto da atividade leiteira (BOYAZOGLU, 2001). O Gráfico 2 ilustra a liderança dos rebanhos da Ásia e Europa na produção de leite ovino no mundo.

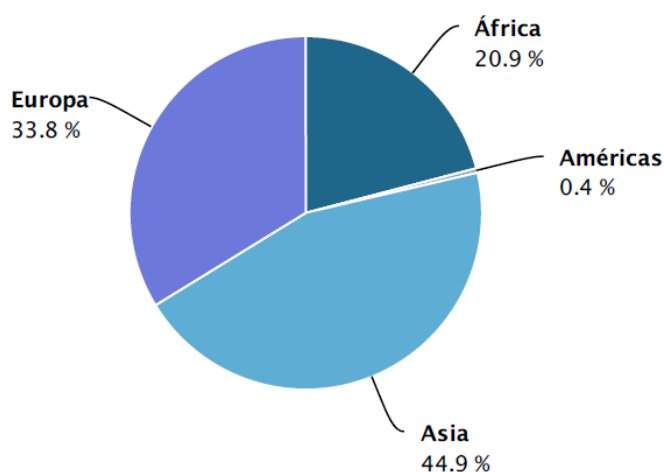


Tabela 1: Produção mundial de leite fresco e integral (toneladas)

Ano	Vacas	Cabras	Búfalas	Camelas	Ovelhas	Total Ovelhas
1997	469.049.387	12.124.498	59.870.383	1.418.033	8.140.922	0,015
1998	475.158.593	12.469.796	62.220.043	1.407.842	8.143.113	0,015
1999	483.639.598	12.592.063	64.717.235	1.415.877	8.120.395	0,014
2000	490.670.118	12.615.028	66.500.380	1.438.565	8.034.045	0,014
2001	497.915.976	12.917.933	69.267.265	1.458.606	8.202.964	0,014
2002	510.108.966	13.337.270	70.859.326	1.475.486	8.233.653	0,014
2003	518.437.028	13.847.039	73.503.775	1.517.266	8.441.900	0,014
2004	528.098.184	14.051.900	76.097.687	1.548.263	8.645.411	0,014
2005	543.969.891	14.511.608	78.889.010	1.565.666	8.857.895	0,014
2006	557.431.558	14.949.785	82.189.954	1.590.938	9.115.176	0,014
2007	566.850.186	15.126.792	85.574.529	1.611.502	9.043.925	0,013

Fonte: FAO, 2009

Gráfico 2: Produção de leite ovino por continente em 2013



Fonte: FAO, 2013

Na Grécia houve uma redução de 30% no número de processadores de queijo entre 1981 e 1994, pois os supermercados exigiram um fluxo de quantidade e qualidade constante a preços competitivos, além de requisitarem novos produtos (HADIJIGEORGIU et al., 1998). Já na França houve um aumento de produção e produtividade dos rebanhos ovinos leiteiros entre 1970 e 1990 (BARILLET, 1993).

No Brasil, a exploração da atividade leiteira ovina em escala industrial ainda é recente. A raça Lacaune foi introduzida no Rio Grande do Sul pela Cabanha Dedo Verde no ano de 1992 (SAUERESSIG, 2010; SELAIVE, 2014). Somente 12 anos depois iniciaram-se os primeiros experimentos totalmente direcionados para a produção comercial de leite pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZUNESP) de Botucatu (EMEDIATO, 2007).

Estima-se que o Brasil processe em torno de 509.000 litros de leite ovino por ano, o que corresponde a aproximadamente 526 toneladas e a apenas 0,0019% do total de leite produzido no país. Entre 2004 e 2010, o Brasil aumentou a sua produção em 5,5% ao ano (SELAIVE, 2014). A estimativa da produção de leite ovino em 2007 está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2. Estimativa do processamento brasileiro de leite ovino em 2007

<b>Estado</b>	<b>Processamento anual – litros</b>	<b>Produtos</b>
RS	148.000	logurte, ricota, doce de leite, queijos
SC	360.000	Queijos
MG	1.000	Queijos, ricota, iogurtes, chantilly
Total	509.000	Ricota, queijos, iogurte, doce de leite, chantilly

Fonte: ROHENKOHL et al., 2009

Citado por Penna (2001), Haenlein (2000) afirma que a principal razão para se criar ovelhas de leite está relacionada com o retorno financeiro da atividade. O custo de produção de 1 kg de queijo de ovelha é em torno de U\$8,00 se comparado a U\$5,00 para queijo de cabra e U\$3,00 para o mesmo queijo feito com leite de vaca. Mesmo assim, o retorno econômico com a produção de leite de ovelha é quase o dobro do retorno com a produção de lã e carne.

Além disso, para produzir 1 kg de queijo, são necessários em torno de 11 litros de leite de vaca, enquanto que para o leite de ovelha são necessários apenas 5,5 litros (CAVALLI et al, 2008). Mesmo assim, quando comparado aos demais tipos de leite, o maior conteúdo de sólidos totais do leite de ovelha e o melhor rendimento industrial não são razões boas o suficiente para convencer o produtor. Entretanto, as ovelhas são espécies mais aceitas devido à variedade de raças e facilidade de

adaptação a diferentes climas e forrageiras (HAENLEIN, 2001). Além disso, os produtos derivados do leite de ovelha são vendidos a preços mais altos, o que vem a ser lucrativo para o produtor.

### 2.1.3.2 Raças leiteiras

Dentre as diversas raças de ovinos com aptidão para produção de leite, podemos destacar as mais produtivas e utilizadas no Brasil, como Lacaune, Bergamácia e EastFriesian.

A raça Lacaune é originária da França, na região de fabricação do queijo Roquefort. Possui aptidão mista para leite e carne, produzindo carne de cordeiros de alta qualidade. Produz em média 1,6 litros de leite por dia em uma lactação de 165 dias, podendo atingir até 4,5 litros no pico de lactação (ARCO; HAENLEIN, 2007).

A raça Bergamácia tem origem na Itália com a exploração de lã e carne, mas o interesse pela atividade leiteira no Brasil foi crescendo desde 1930. Sua produção é, em média, de 250kg de leite durante um período de 160 dias, ou seja, 1,5kg por dia (GRIEBLER, 2012).

A raça EastFriesian é originária da França, denominada Frisona no Uruguai e Frisona Milchschaft na Argentina. É predominantemente leiteira, mas com aptidão para lã e carne. Sua produção média de leite é de 380 a 450 litros em 220 dias de lactação, podendo alcançar 520 litros em ovelhas selecionadas. Seu leite contém de 6 a 7% de gordura, 4 a 4,5% de proteína e cerca de 20% de sólidos, fornecendo um alto rendimento para a produção de queijos (ARCO, s.d.).

## 2.2 Leite de ovelha

### 2.2.1 Composição

O leite ovino é um produto que contém alta concentração de sólidos totais e é usado principalmente para a fabricação comercial ou artesanal de queijos finos e iogurtes (FUERTES et al, 1998; SELAIVE & OSÓRIO, 2014). Esse leite possui uma composição diferenciada dos demais (cabra, vaca, humano), com valores que o tornam altamente nutritivo (Tabela 3). Apresenta sabor suave e ligeiramente adocicado, com certa cremosidade que persiste ao paladar.

Em comparação ao leite caprino e bovino, o leite ovino é caracterizado por possuir maior concentração de gordura e proteína, o que o leva a ser mais utilizado para a produção de queijos; maior opacidade, coloração mais branca pela falta de caroteno na gordura e maior resistência a proliferação de microrganismos nas primeiras horas após ordenha, devido às propriedades imunológicas e maior concentração de minerais, principalmente o cálcio. Quase metade dos ácidos graxos presentes no leite ovino é de mono e poli-insaturados, favoráveis para a saúde humana (PULINA, 2004; SELAIVE & OSÓRIO, 2014).

Selaive (2014) afirma que o rendimento e a composição do leite podem sofrer variações. Eles dependem de fatores intrínsecos como a raça, idade, número de lactações, estado corporal e sanitário e de fatores extrínsecos, ou do meio ambiente, principalmente a alimentação.

Citado por Silva (2014), Bencini (2001) afirma que, como a quase totalidade do leite de ovelha é transformado em queijo e outros derivados, como iogurte e sorvete, a qualidade do leite está diretamente relacionada ao seu rendimento industrial. A quantidade e a qualidade do queijo dependem principalmente do tempo de coagulação, da taxa de formação e da consistência do coágulo. Essas propriedades são afetadas pela composição do leite, pela contagem de células somáticas e pelo próprio processamento industrial. Portanto, qualquer fator que afete a composição do leite, também afetará a produção e qualidade dos derivados lácteos.

Tabela 3. Composição físico-química do leite de diferentes espécies

<b>Constituinte</b>	<b>Ovelha</b>	<b>Cabra</b>	<b>Vaca</b>	<b>Mulher</b>
Matéria seca (%)	17,4-18,9	11,9-14,0	10,5-14,3	11,5-13,9
Gordura (%)	6,0-7,5	4,1-4,5	2,8-4,8	3,7-4,6
Energia (kcal)	108	69	61	70
Proteína total (%)	5,98	3,56	3,29	1,03
Albumina globulina (%)	0,9-1,1	0,4-1,0	0,3-0,8	0,8-1,7
Caseína (%)	4,3-4,6	2,5-3,3	2,5-3,6	0,4
Lactose (%)	4,3-4,8	4,1-4,4	4,2-5,0	6,4-7,0
Cinzas (%)	0,9	0,8	0,7-0,9	0,2
Cálcio (mg/100g)	193	134	119	32
Sódio (mg/100g)	44	50	49	17
Ferro (mg/100g)	0,10	0,05	0,05	0,03
Magnésio (mg/100g)	18	14	13	3
Zinco (mg/100g)	0,57	0,30	0,38	0,17
Fósforo (mg/100g)	158	111	93	14
Vitamina A (mg/l)	0,5	-	0,3	-
Vitamina B6 (µg/100g)	80	60	60	10
Vitamina B12 (µg/100g)	0,71	0,07	0,36	0,05
Vitamina E (mg/l)	15,8	-	7	-
Vitamina C (mg/l)	40	-	22	-

Fonte: FERREIRA, 2007

### 2.2.1.1 Minerais

O leite de ovelha contém ao redor de 0,9% de minerais totais ou cinzas quando comparados com 0,7% do leite de vaca (JUAREZ, 1986).

Sódio, potássio e cloro são quase inteiramente solúveis e completamente disponíveis no soro. Cálcio, magnésio e fósforo estão associados às micelas de

caseína, fazendo com que sejam parcialmente retidos no coalho durante a fabricação do queijo. A proporção cálcio:fósforo no leite de ovelha é próxima à perfeição. Além disso, esse leite fornece 254% das necessidades diárias de cálcio das crianças, ao passo que o leite de vaca fornece apenas 170% (Tabela 4) (CAMPOS, 2011).

Tabela 4. Comparação entre o leite de ovelha e de vaca em relação as necessidades humanas diárias de minerais

<b>Minerais</b>	<b>Necessidades diárias (mg)</b>	<b>Leite de ovelha (mg/L)</b>	<b>Leite de vaca (mg/L)</b>
Cálcio	800	2030	1360
Fósforo	1000	1330	850
Potássio	1500	1460	1520
Magnésio	300	170	120
Cobre	2	0,34	0,12
Ferro	12	1,05	0,6
Sódio	1150	360	460
Zinco	7	7,42	3,9

Fonte: CAMPOS, 2008

### 2.2.1.2 Proteínas

As proteínas do leite possuem diversas propriedades biológicas, fornecendo aminoácidos necessários para o crescimento e desenvolvimento e exercendo funções fisiológicas mais específicas.

Dentre as diversas proteínas que compõem o leite ovino, a caseína corresponde a cerca de 85%. O conteúdo proteico é variável e depende da raça, do manejo, da alimentação e da fase de lactação, sendo que sua concentração aumenta de maneira contínua durante a lactação (PELLEGRINI, 2012).

As imunoglobulinas são proteínas que fazem parte do sistema de defesa e a IgA é a mais predominante no colostro e no leite. A lactoferrina é considerada uma das mais importantes proteínas de defesa encontradas no leite e é responsável por regular as respostas inflamatórias e imunes. A caseína do leite de ovelha é facilmente digerida e encontrada em concentrações três vezes maiores que no leite de vaca ou de cabra.

As caseínas são compostas pelas frações alfa-S1, alfa-S2, beta e kapa e as suas percentagens variam de acordo com a espécie, já que é uma característica genética. A beta-caseína representa cerca de 50% do total de caseínas desse leite, contra 2/3 do total no leite de cabra e 1/3 no leite de vaca. Estas diferenças nas quantidades de caseína explicam diferenças na estrutura da micela, o que resulta na variação de sua estabilidade e coagulação, e a ocorrência de menor sabor amargo nos derivados lácteos (GOETZE, 2010). O leite de ovelha possui quantidades menores de caseína alfa-S1, responsável pelo coalho mais firme. O coalho é menos rijo e mais maleável que o do leite de vaca, podendo ser quebrado mais facilmente (CAMPOS, 2011).

As proteínas do leite humano e ovino estão em menores proporções (proporcionais ao porte do animal e dos humanos) e, por isso, bebês, enfermos e artríticos toleram bem o leite de ovelha (CAMPOS, 2011).

### 2.2.1.3 Lipídeos

A gordura é um dos componentes mais importantes do leite de ovelha, pois tem função nutricional e influencia as características físicas e organolépticas. Está presente no leite em forma de glóbulos e sua quantidade pode variar em função da raça, alimentação, período de lactação, etc (GUTIÉRREZ, 1991). O leite de ovelha apresenta ainda a peculiaridade de não apresentar caroteno em sua gordura, o que é responsável pela brancura típica deste leite (FURTADO, 2003).

A concentração de lipídeos no leite ovino é duas vezes maior que no leite de vaca e de cabra. Os glóbulos de gordura são menores, o que torna o leite mais homogêneo. Quanto menores os glóbulos de gordura, mais fácil a digestão e menor

chance de causarem aumento nos níveis de colesterol. Além disso, propicia uma maior superfície para ação das enzimas, permitindo que esse leite seja digerido mais facilmente. As vitaminas A, D e E são lipossolúveis e, portanto, são encontradas entre as gorduras do leite ovino (CAMPOS, 2011).

Dentre os ácidos graxos presentes no leite ovino, 45% são mono e polinsaturados. Os de cadeia média são benéficos para doenças cardíacas, renais, epilepsia em crianças e também são limitantes na deposição de colesterol. A recomendação de ingestão diária de 15g desses ácidos graxos pode ser suprida com a ingestão de aproximadamente 60g de manteiga de ovelha. Esse leite também contém maior quantidade de ácidos graxos saturados de cadeia média e curta e acredita-se que isto leve à maior absorção da lactose, o que acaba sendo benéfico aos intolerantes à lactose. Além disso, contém ácido láctico, uma forma conversora da lactose que a torna facilmente aceita por essas pessoas (CAMPOS, 2011).

As gorduras do leite de ovelha possuem, ainda, o mais alto nível de ácido linoleico conjugado (CLA) e de ácido vacênico, seu precursor fisiológico. Vários estudos sugerem que este componente é responsável pela diminuição dos níveis de glicose e aumento da resistência insulínica (KHANAL, 2004).

#### 2.2.1.4 Lactose

A lactose é o maior carboidrato presente no leite de ovelha. Seu teor é similar ao do leite bovino. Entretanto, os níveis em gorduras e proteínas são bem maiores, o que torna a proporção da lactose em relação aos sólidos totais menor no leite de ovelha (22 – 27% contra 33 – 40%, respectivamente). Além de favorecer a absorção intestinal de cálcio, magnésio e fósforo e a utilização de vitamina C, sua quebra permite que pessoas com intolerância à lactose consumam queijos maturados (CAMPOS, 2011).

A lactose serve também como fonte de energia para as bactérias ácido-láticas que participam da transformação do leite em seus derivados (BRITO, 2004).



## 2.2.2 Derivados lácteos

O leite de ovelha tem como principal destino os derivados lácteos em função do seu alto teor de sólidos. Os queijos e iogurtes são os principais produtos fabricados com esse leite, seguidos pelos sorvetes e doces de leite.

O leite ovino também é uma matéria prima muito utilizada para a fabricação de cosméticos para uso humano, como os sais de banho, sabonetes em barra e cremoso, creme para as mãos e pés, cremes faciais e corporais, shampoo, condicionadores, entre outros.

### 2.2.2.1 Queijos

Devido ao alto teor de gordura do leite de ovelha, o rendimento para a produção de queijos é muito superior aos leites de vaca e cabra (cerca de 5 litros de leite/kg de queijo), o que é positivo para a indústria e para o produtor que poderá exigir um preço diferenciado por este leite (OCHOA-CORDERO et al., 2002).

Os queijos podem ser classificados de várias formas, segundo sua matéria prima, consistência, tratamento da massa e método de obtenção, formas de coagulação, teor de gordura e de umidade (CAMPOS, 2010).

Muitos queijos de leite ovino possuem a certificação de origem protegida (Tabela 5), como o Manchego, Serra da Estrela e Pecorino. Isto protege os direitos sobre o processamento dos queijos, muitas vezes centenários, e agrega valor ao produto (SIQUEIRA, 2013).

Na região Sul do Brasil há um queijo fabricado a partir do leite de ovelhas Lacaune, denominado Fascal e considerado o primeiro queijo de leite de ovelha desenvolvido no país. É elaborado com leite cru e culturas iniciadoras comerciais e, posteriormente, submetido a um período mínimo de maturação de 90 dias. Esta maturação atende à legislação brasileira, que prevê a comercialização de queijos

elaborados com leite cru apenas após maturação mínima de 60 dias (NESPOLO, 2009).

Diversos autores já estudaram a composição físico-química dos queijos fabricados com leite de ovelha. Preis (2011) encontrou valores distintos para o queijo Minas curado, com 15, 30 e 45 de maturação (Tabela 6), resultando em 24,82% de proteína, 17,81% de gordura, 48,69% de umidade e 2,9% de cinzas. Já Pellegrini et al (2013) avaliaram os parâmetros físico-químicos dos queijos tipo Pecorino Toscano fresco (PT0), com 90 (PT90), 180 (PT180), 270 (PT270) dias de maturação, Feta (FT) e Labneh (LB) e encontraram 24,6, 19,45 e 15,99% de proteína, 35,83, 27,31 e 18,81% de gordura, 33,62, 44,93 e 38,33% de umidade e 4,15, 5,12 e 1,04% de cinzas para os três queijos, respectivamente (Tabela 7). Emediato et al. (2009) estudaram a composição do queijo prato elaborado com leite de ovelhas Bergamácia e obtiveram valores médios de 24,64, 19,47, 44,52 e 5,25% para proteína, gordura, umidade e cinzas, respectivamente. Para o queijo Fascal, fabricado com leite cru de ovelhas Lacaune puras e mestiças e maturado por 90 dias, Nespolo (2009) encontrou 24,55, 32,14, e 37,27% para proteína, umidade e gordura, respectivamente.

Tabela 5. Principais queijos de ovelha com denominação de origem

<b>País</b>	<b>Queijo</b>
França	Roquefort, Abbaye de Belloc, Perail
Itália	CanestratoPugliese, Fiore Sardo, Pecorino Romano/Sardo/Toscano
Inglaterra	Friesla, Olde York
Irlanda	Orla
Espanha	Castellano, Idiazabal, Manchego, Roncal, Zamorano
Portugal	Serra da Estrela
Grécia	Kefalotiri, Myzithra, Feta*
Turquia	BeyazPeynir, MihalicPeynir
República Tcheca	Abertam
Romênia	Brinza

Fonte: Harbutt, 1999

Tabela 6: Características físico-químicas de queijo minas curado de leite de ovelha

Parâmetros	Tempo de análise (dias)		
	15	30	45
Acidez em ácido láctico (%)	0,03	0,05	0,06
pH	5,9	6,04	5,84
Umidade (%)	52,69	50,33	48,69
Estrato Seco Total (%)	47,3	49,67	51,31
Gordura (%)	23,19	17,96	17,81
Estrato Seco Desengordurado (%)	24,1	31,71	33,5
Gordura no Estrato Seco (%)	49,04	36,17	34,7
Cinzas (%)	2,11	2,22	2,9
Proteínas (%)	50,75	28,22	24,82

Fonte: Preis, 2011

Tabela 7: Parâmetros físico-químicos de queijo tipo Pecorino Toscano fresco (PT0), com 90 (PT90), 180 (PT180), 270 (PT270) dias de maturação, Feta (FT) e Labneh (LB) produzidos com leite de ovelha

Parâmetros	Queijo Tipo					
	PT0	PT90	PT180	PT270	FT	LB
pH	5,89c	6,02b	6,15a	5,86c	6,16a	4,41d
Acidez em ácido láctico (%)	0,66c	0,42d	0,48d	0,86b	0,35e	1,01a
Proteínas (%)	24,60c	26,42b	28,25a	28,29a	19,45d	15,98e
Gordura (%)	33,51c	35,82b	37,89a	37,48a	27,30d	18,81e
Umidade (%)	33,62c	30,26d	25,95e	25,14e	44,93a	39,33b
Cinzas (%)	4,15c	4,96ab	5,05ab	5,17a	4,89b	1,04d

Médias, seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

Fonte: Pellegrini et al, 2013

A importação de queijos pelo Brasil, provenientes da União Europeia, Nova Zelândia, Austrália e Estados Unidos da América, tem aumentado. O consumo per

capita, no Brasil, era de 3,4 kg de queijo ao ano em 2010, com crescimento médio de 2,7% ao ano no período de 2000 a 2010. Em outros países como Argentina e Canadá, o consumo per capita é de mais de 10 kg por ano (FAO, 2011; SELAIVE, 2014).

#### 2.2.2.2 Iogurtes

Os iogurtes de leite de ovelha possuem características próprias, como consistência cremosa devido, principalmente, à sua densidade pelo alto teor de sólidos totais. Sendo assim, não há necessidade de adicionar estabilizantes e espessantes (GRIEBLER, 2012). A lactose é facilmente digerível, pois cerca de 50% de sua concentração já foi hidrolisada durante a fermentação (BRANDÃO, 1995).

O iogurte de leite ovino tem o dobro de cálcio e proteínas que o de leite de vaca, e 50% mais ferro. Além disso, é rico em vitaminas A, D, C, E, as vitaminas do complexo B e contém menos sal (CAMPOS, 2011).

A qualidade do iogurte é diretamente influenciada pela composição do leite. Em geral, o aumento do teor de sólidos totais do leite de 12% a 20% favorece a obtenção de produtos com maior consistência e menor sinérese. O teor de gordura do leite favorece a qualidade do iogurte, pois a gordura é capaz de estabilizar a formação de gel proteico, previne a separação de soro no produto final e melhora as características sensoriais do produto, influenciando na maciez, cremosidade, sabor e aroma do iogurte (LIMA, 2001).

Abreu (2014) encontrou para o iogurte natural de leite de ovelha os valores de 83,77% de umidade, 5,84% de lipídios, 5,56% de proteína, 4,59% de glicídios e 0,24% de resíduo mineral fixo (Tabela 8).

Tabela 8: Caracterização físico-química do iogurte do leite de ovelha

<b>Caracterização</b>	<b>Valores</b>	<b>Legislação</b>
Umidade (%)	83,77 ± 0,42	-
Lipídios (%)	5,84 ± 0,52	3 a 5,9 - Integral
Proteína (%)	5,56 ± 0,55	Mínimo 2,9
Lactose (%)	4,59 ± 0,47	-
Cinzas (%)	0,24 ± 0,65	-
Acidez em ácido láctico (g/100g)	1,10 ± 0,30	0,6 a 2
pH	4,63 ± 0,20	-

Fonte: ABREU, 2014

### 2.2.3 Microbiologia

Não existem muitos estudos a respeito da microbiota natural do leite de ovelha. No entanto, alguns estudos apresentam o gênero *Enterococcus* como sendo o mais isolado. Chanos (2011) isolou 17 bactérias ácido lácticas de leite de ovelhas da Grécia destinados a produção de queijo Feta. Esses isolados eram produtores de uma bacteriocina anti-*Listeria* e foram identificados como sendo do gênero *Enterococcus*. Acurcio (2011) estudou as bactérias ácido-lácticas de leite ovino de Jaboticatubas - MG e identificou 100% dos isolados como sendo dos gêneros *Enterococcus* e/ou *Lactococcus*. Acurcio (2011) também cita que Medina et al. (2001), ao isolarem bactérias ácido-lácticas do leite de ovelha do Nordeste argentino, detectaram uma prevalência de 70% de bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* em comparação a 30% do gênero *Lactobacillus*. Oksuztepe, Patir e Çalicioglu (2005) observaram que 22 a 33% das bactérias avaliadas durante a maturação de um queijo feito com leite cru eram do gênero *Enterococcus*, porém, o gênero predominante observado pelos autores foi o *Lactobacillus*. Abd El Aal e Awad (2008) identificaram amostras de *E. faecium* e *E. faecalis* em 44% dos leites de ovelhas testados, assim como Arizcun, Barcina e

Torre (1997), que encontraram prevalência de *E. faecalis*, em menor proporção, *E. faecium*, *E. durans* e *E. avium*.

Para aos critérios higiênicos e bacteriológicos do leite de ovelha, existe o Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia que define que o leite cru deve apresentar uma média geométrica de contagens de micro-organismos em placas a 30°C, correspondente a um período de dois meses, com pelo menos duas análises mensais,  $\leq 500.000$  UFC/ml para o leite usado na fabricação de produtos que não inclua nenhum tratamento térmico. Não há referência a Contagem de Células Somáticas (CCS).

## 2.3 Bactérias lácticas

### 2.3.1 Conceito

As bactérias ácido lácticas (BAL) fazem parte de um grupo composto por 13 gêneros: *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactoshaepa*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus* e *Weisella* (JAY et al, 2005). O grupo inclui cocos e bastonetes Gram positivos, catalase negativos, não esporulados, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos. São produtores de ácidos, conseguem se multiplicar em pHs baixos como 3,8 e são principalmente mesófilas, ou seja, crescem em uma faixa de temperatura que varia de 5 a 45°C (SALMINEN, 1993; FORSYTHE, 2013).

As BAL podem ser classificadas como *starter* ou indicadoras, quando são capazes de metabolizar a lactose; e não *starter*, quando se apresentam durante o processo de fabricação e estocagem (WILLIAMS, 2000). Ainda podem ser divididas em homofermentativas, quando produzem duas moléculas de ácido láctico para cada molécula de glicose utilizada; e heterofermentativas, quando são capazes de produzir vários compostos como ácido láctico, etanol, ácido acético, dióxido de carbono e ácido fórmico. Produzem, também, um grande número de enzimas

glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas que transformam os nutrientes do meio, modificando a estrutura e o aroma dos produtos fermentados (ORTOLANI, 2009).

Essas bactérias, além de fazerem parte da flora intestinal adquirida dos seres humanos, são encontradas em uma ampla variedade de alimentos como vegetais, vinhos, leite e carnes (FORSYTHE, 2013). Além disso, possuem uma importância econômica, pois são responsáveis pela fermentação de uma grande variedade de alimentos, de forma natural ou adicionadas intencionalmente. Suas atividades metabólicas contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais e desejáveis e permitem conservar ou aumentar o valor da matéria-prima (MAGRO et al., 2000). Em alguns sistemas alimentares, as BAL são utilizadas visando o aumento da vida de prateleira e da segurança através da sua aplicação ou da aplicação de seus metabólitos antimicrobianos (ROSS et al., 2002)

### 2.3.2 Atividade antimicrobiana

As BAL são capazes de inibir outras bactérias através da competição por nutrientes ou através da produção de diversas substâncias antimicrobianas (OUWEHAND, 2004).

A atividade antimicrobiana das BAL se baseia, principalmente, na capacidade de produzirem uma grande quantidade de ácidos orgânicos, por fermentarem os carboidratos presentes nos alimentos e conseqüentemente reduzirem o pH (MAGRO et al., 2000a). Além disso, possuem a capacidade de produzir outras substâncias inibitórias, como peróxido de hidrogênio, diacetil, metabólitos de oxigênio e bacteriocinas (PIARD, 1991).

Os ácidos orgânicos têm sua atividade antimicrobiana baseada fundamentalmente na sua interferência nos mecanismos de transporte ativo da membrana citoplasmática das células bacterianas.

A concentração de ácidos divide os alimentos em dois grupos: os de baixa acidez, com pH acima de 4,5, e os de alta acidez, com valores abaixo de 4,5. O valor do pH é muito importante em termos de segurança alimentar, pois muitos

micro-organismos de importância em saúde pública, como o *Clostridium botulinum*, são incapazes de se multiplicar em pH abaixo de 4,5.

A produção de peróxido de hidrogênio ocorre devido a carência da enzima catalase nas BAL. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode causar oxidação da membrana de outras bactérias, além de causar a formação de hipotiocianato, um antimicrobiano produzido pela ativação do sistema de lactoperoxidase no leite fresco.

O dióxido de carbono em solução forma o ácido carbônico, que é um ácido fraco capaz de inibir a multiplicação de alguns micro-organismos sem afetar as BAL. Por essa razão, as embalagens com atmosfera modificada alteram a flora deteriorante (FORSYTHE, 2002).

Além disso, as BAL são produtoras de bacteriocinas, substâncias com potencial de biopreservação de alimentos (JACK et al., 1995). A comunidade científica e as indústrias alimentícias têm demonstrado interesse por esses compostos antimicrobianos, pois estão relacionados com a inibição de algumas bactérias deteriorantes e patogênicas (ADAMS, 1997; MAGRO et al., 2000a). A nisina é a bacteriocina mais estudada produzida pelas BAL. É um peptídeo modificado produzido pelo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e possui um amplo espectro inibitório contra bactérias Gram-positivas. É muito utilizada em alguns alimentos como queijos e enlatados e é estável em alimentos ácidos (FORSYTHE, 2002).

Vários autores como Vaughan et al. (1994), Breashers (1999), Uraz et al. (2001), Alexandre (2002) e Caridi (2003) demonstraram o poder de inibição das BAL frente a patógenos e deteriorantes, como *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e bactérias do grupo coliforme, mostrando a importância do uso desses microrganismos para a preservação de alimentos e para o controle de patógenos.

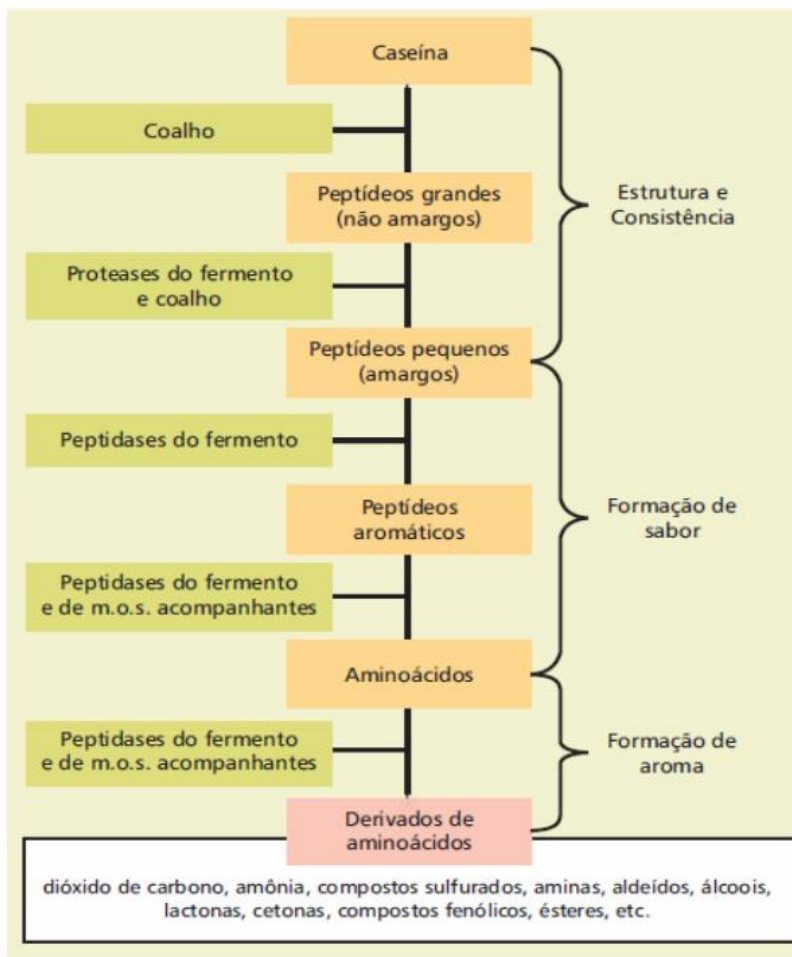
### 2.3.3 Atividade proteolítica

A proteólise é um pré-requisito para o crescimento das BAL e consequente degradação das proteínas do leite, efeito de grande importância para a produção de queijos e para o desenvolvimento de aroma e sabor (FORSYTHE, 2002).



Na primeira etapa da proteólise ocorre a quebra das proteínas (caseínas) em peptídeos maiores que serão posteriormente degradados em peptídeos menores, podendo alguns, conferirem sabores amargos. Posteriormente, com a quebra desses peptídeos menores, o sabor amargo desaparece e há liberação de aminoácidos que contribuem para o sabor do queijo, mas que influenciam pouco no aroma. Os compostos aromáticos serão formados a partir da degradação de aminoácidos, levando a formação de grande quantidade e variedade desses compostos (Figura 1) (HANSEN, 2006).

Figura 1: Evolução da proteólise em queijos



Fonte: HANSEN, 2006

Pode-se afirmar, ainda, que a consistência e o sabor do queijo vão depender muito da proteólise que vai ocorrer durante a maturação. Nas primeiras semanas o coalho hidrolisa a fração  $\alpha$ -S1 da caseína, enfraquecendo a rede proteica. A hidrólise da  $\beta$ -caseína e dos peptídeos vai ocorrer, principalmente, devido à

atividade proteolítica da plasmina, da quimosina e das enzimas bacterianas do fermento lácteo (PEREDA, 2005).

#### 2.3.4 Produção de diacetil

Algumas culturas lácticas como o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e o *Lactococcus mesenteroides* subsp. *cremoris* são capazes de metabolizar o excesso de piruvato através do  $\alpha$ -acetolactato, produzindo acetoína. Entretanto, na presença de oxigênio, o  $\alpha$ -acetolactato é convertido em diacetil, um composto responsável pelo aroma característico da manteiga e de alguns iogurtes (FORSYTHE, 2002).

Esse composto tem um poder de inibição no crescimento de bactérias Gram-negativas por reagir com a proteína de ligação da arginina, afetando a sua utilização (CAMARA, 2012). Jay (1982) demonstrou que o diacetil é mais eficaz contra bactérias Gram-negativas, bolores e leveduras do que contra bactérias Gram-positivas.

#### 2.3.5 Produção de gelatinase

A gelatinase é uma endopeptidase extracelular de zinco capaz de hidrolisar várias substâncias, como a gelatina, o colágeno e a caseína (JETT et al., 1994). Singh et al. (1998) demonstraram que a produção de gelatinase aumenta a patogenicidade dos micro-organismos em animais. Esta enzima causa danos aos tecidos do hospedeiro, permitindo a migração e proliferação bacteriana. Por isso, tem sido pesquisada em isolados destinados ao uso como culturas *starter*.

A ausência de gelatinase é importante nos *Enterococcus* utilizados na produção de alimentos, onde a segurança tem que ser comprovada caso a caso (LOPES et al., 2006).

### 2.3.6 Produção de exopolissacarídeos

Algumas BAL produzem polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos, que podem ser de dois tipos: homopolissacarídeos, compostos apenas de frutose ou glicose, ou heteropolissacarídeos, constituídos por unidades repetidas de diferentes açúcares, como glicose, galactose, frutose e ramnose (DE VUYST et al., 2001).

Segundo Jolly et al. (2002), os exopolissacarídeos estão envolvidos em uma grande variedade de funções biológicas, incluindo a proteção contra estresses ambientais e a aderência a diferentes superfícies. Perry et al. (1997) testaram isolados produtores de exopolissacáridos em queijo Mozzarella magro com o objetivo de aumentar a umidade e melhorar o rendimento e obtiveram sucesso. No entanto, os exopolissacarídeos são utilizados essencialmente na melhoria da textura e do sabor de produtos lácteos fermentados, como os iogurtes (WELMAN, 2003).

A procura dos consumidores por produtos com baixos teores de matéria gorda e açúcares e baixos níveis de aditivos faz com que a produção de exopolissacarídeos em nível industrial seja uma alternativa viável (JOLLY et al., 2002).

### 2.3.7 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Os antibióticos têm sido utilizados, ao longo dos anos, de forma indevida e generalizada contra diversas infecções bacterianas. Isto tem possibilitado às bactérias se adaptarem e desenvolverem resistência a muitos deles (MATHUR, 2005). As BAL, além de adquiriram resistência a determinados antibióticos, também transmitem essa resistência a bactérias patogênicas através de genes (AMMOR et al., 2007; MATHUR, 2005; TEUBER et al., 1999).

A resistência aos antibióticos pode ser de dois tipos: intrínseca ou inata e extrínseca. Na resistência intrínseca os micro-organismos são resistentes a alguns

agentes antimicrobianos sem terem sido previamente expostos a estes agentes, pois não possuem o local alvo do fármaco ou o princípio ativo não consegue atravessar a parede celular. Já a resistência extrínseca é adquirida através de mutações espontâneas ou através da transmissão de genes a partir de outras bactérias que lhe confirmam resistência extracromossomal (plasmídeos) (DOYLE, 2006; TENOVER, 2006).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção das amostras**

A amostra de leite ovino foi obtida na Cabanha Dedo Verde localizada no município de Viamão no Rio Grande do Sul. O leite foi coletado diretamente do tanque de resfriamento, armazenado em frasco estéril e transportado em caixa isotérmica mantida sob refrigeração até o laboratório.

Para o isolamento dos micro-organismos, alíquotas de 1 ml do leite foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 9 ml de cloreto de sódio 0,85%. Foram feitas diluições subsequentes até  $10^{-6}$ . Alíquotas de 100 $\mu$ l de cada uma das diluições foram semeadas pelo método de superfície e espalhados com alça de Drigalsky em placas de Petry contendo ágar MRS, seletivo para o crescimento de bacilos, e ágar M17, seletivo para o crescimento de cocos, e incubadas a 30°C por 48 horas.

#### **3.2 Caracterização preliminar**

Para a seleção das BAL com as características desejadas, realizou-se uma pré-seleção baseada na morfologia das colônias (pequenas, brancas ou esbranquiçadas e arredondadas). Estas colônias foram retiradas das placas com

alça de platina individualmente e passadas para meio caldo MRS ou caldo M17. Após incubação a 30°C por 48 horas foi feita uma semeadura por esgotamento em meio Agar MRS ou Agar M17. Após a incubação nas mesmas condições descritas anteriormente as colônias foram avaliadas e testadas para a prova de coloração de Gram e o teste de catalase.

Todos os isolados que apresentaram as características de Gram positivos e catalase negativos passaram por uma caracterização preliminar constituindo-se de formação de tetrada, produção de CO<sub>2</sub> a partir da glicose, crescimento a 10 e 45° C, pH 4,4 e 9,6 e NaCl 6,5 e 18% (SALMINEN, 2004).

### **3.3 Avaliação das propriedades tecnológicas**

#### **3.3.1 Atividade antimicrobiana**

Para avaliar a atividade antimicrobiana, cada cultura foi semeada em duplicata na forma de picada em placas contendo ágar MRS e incubada a 30°C por 48 horas. As culturas indicadoras *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, 1 ml de cada cultura indicadora foi inoculado em 100 ml de ágar TSB semi-sólido (0,6%) e vertido sobre as placas contendo as BAL que permaneceram em estufa a 37°C por 24 horas. A atividade antimicrobiana das BAL frente aos micro-organismos indicadores foi verificada através da formação de um halo de inibição ao redor das culturas lácticas.

### 3.3.2 Perfil de acidificação

O perfil de acidificação das BAL foi determinado pela alteração do pH conforme o passar do tempo. Para a realização do teste foi feito um pré-inóculo das culturas lácticas a serem testadas em tubos contendo 4 ml de caldo MRS e estas foram incubadas a 30°C por 24h. Após decorrido este tempo, foi retirado 1 ml de cada tubo e inoculado novamente em caldo MRS para uma segunda ativação e incubados a 30°C por 24h. Tubos falcons contendo 10 ml de caldo MRS, leite UHT integral e desnatado foram inoculados com 1 ml das culturas ativadas e foram incubados a 30°C. O pH foi medido em 0, 6, 12, 24 e 48 horas com fita de pH. Os testes foram feitos em duplicata (RIBEIRO, 2013).

### 3.3.3 Atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica, as BAL foram semeadas em forma de picada em placas de Petry contendo ágar leite desnatado. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. A atividade proteolítica foi indicada pela formação de uma zona clara ao redor das culturas e o diâmetro dos halos foi medido em milímetros (FRANCIOSI et al., 2009). Como controle positivo, foi usada a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. O teste foi realizado em triplicata.

### 3.3.4 Produção de diacetil

A produção de diacetil foi determinada através do método proposto por King (1948), onde foi feito um pré-inóculo das culturas em caldo MRS, incubadas a 30°C por 24h. Após esse período, 1 ml de cada suspensão de células foi transferido para

tubos estéreis, foram adicionados 0,5 ml de uma solução de  $\alpha$ -naftol (1%, w / v) e 0,5 ml de KOH (16%, w / v) e incubou-se a 30°C durante 10 min. A produção de diacetil foi indicada pela formação de um anel de vermelho na parte superior dos tubos. Como controle positivo foi utilizado leite integral não inoculado. O teste foi feito em duplicata.

### 3.3.5 Produção de Exopolissacarídeo

As culturas isoladas foram testadas para a produção de exopolissacarídeos através do método de ágar com vermelho congo, preparado através da adição de Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI) a 37 g/l, sacarose a 50 g/l, agar a 10 g/l e indicador de vermelho Congo a 8 g/l. O corante foi preparado e autoclavado (121°C / 15 min) separado dos outros constituintes do meio. A seguir, foi adicionado à infusão BHI com ágar e sacarose autoclavados a 55°C.

As BAL foram semeadas em forma de esgotamento nas placas e incubadas a 37°C durante 24 horas. Foi usado como controle positivo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. A produção de exopolissacarídeos é indicada através da coloração preta das colônias com aspecto cristalino (FREEMAN et al., 1989).

### 3.3.6 Avaliação da segurança

Para avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados aos antibióticos, as culturas lácticas isoladas foram confrontadas com amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, cefalexina, cefotaxima, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina. As suspensões das BAL foram ajustadas para o valor de 0,5 da escala McFarland e semeadas com suabe em placas contendo Ágar MRS. Em seguida, discos com cada antimicrobiano foram colocados sobre a superfície das placas de MRS contendo as bactérias. As placas

foram incubadas a 37°C por 48 horas e a formação de halos foi observada pela medida do diâmetro em torno dos discos (mm) (HOSSEINI et al., 2009).

Para avaliar a produção de gelatinase, as culturas foram inoculadas com agulha em tubos contendo ágar gelatina. Após 48 horas, foram considerados positivos os tubos onde se verificou a liquefação do meio. Como controle positivo, foi utilizada a cultura de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### 3.3.7 Coexistência entre os isolados

Para analisar a coexistência entre os isolados, foi utilizado o método de inoculação cruzada, onde foi preparada uma placa contendo ágar MRS para cada um dos isolados que foram semeados em uma linha única no centro da placa. A seguir, os outros isolados foram semeados em linha formando um ângulo de 90° do isolado central. O antagonismo foi verificado através da formação ou não de uma zona de inibição entre os isolados (GUO et al., 2010).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização preliminar

A amostra de leite utilizada resultou na seleção de 24 colônias de bactérias conforme as diferentes morfologias observadas. Destas, cinco se mostraram Gram positivas e catalase negativas e foram identificadas de acordo com o meio de cultura onde foram isoladas.

De acordo com os dados da Tabela 9 quanto a morfologia, formação de tetrada, produção de CO<sub>2</sub>, crescimento a 10 e 45°C, NaCl 6,5 e 18% e pH 4,4 e 9,6, das cinco culturas que se mantiveram em análise, duas foram identificadas como



sendo do gênero *Lactobacillus* (MRS5 e MRS6) e três como sendo do gênero *Enterococcus* (MRS1, MRS2 E M173). Esses resultados vão ao encontro do que alguns autores já identificaram, como Chanos (2011) que encontrou 100% dos seus isolados do gênero *Enterococcus*, Acurcio (2011) que identificou 100% dos isolados como sendo dos gêneros *Enterococcus* e/ou *Lactococcus*. Medina et al. (2001) que detectaram uma prevalência de 70% de bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* e 30% do gênero *Lactobacillus* e Oksuztepe (2005) que observou 22 a 33% das bactérias como sendo do gênero *Enterococcus* e o gênero predominante foi o *Lactobacillus*.

Durante a fabricação do queijo, as BAL são expostas a diferentes concentrações de sal e temperaturas elevadas. Neste trabalho, todos os *Enterococcus* suportaram bem a temperatura de 45°C e foram resistentes a altas concentrações de sal (Tabela 9), assim como no estudo de Ribeiro (2013) que demonstrou o crescimento de 100% dos *Enterococcus* isolados a 45°C e a uma concentração de sal de 10%. Além disso, estes mesmos isolados cresceram à temperatura de 10°C e um teor de sal menor, o que também é importante, pois algumas variedades de queijos são fabricadas nessas condições.

Tabela 9: Características das BAL isoladas neste trabalho

Cultura	Morfologia	Tetrada	CO <sub>2</sub>	10°C	45°C	6,5%	18%	pH	pH
						NaCl	NaCl	4,4	9,6
MRS1	Coco	-	-	+	+	+	+	+	+
MRS2	Coco	-	-	+	+	-	+	+	+
MRS5	Bacilo curto	-	-	+	-	+	-	+	+
MRS6	Bacilo curto	-	-	+	-	+	-	+	+
M173	Coco	-	-	+	+	+	+	+	+

## 4.2 Avaliação das propriedades tecnológicas

### 4.2.1 Atividade antimicrobiana

Na avaliação da atividade antimicrobiana, o diâmetro dos halos de inibição (Figura 2) foi medido e dois isolados (40%) apresentaram atividade contra todas as culturas indicadoras. Um isolado (20%) apresentou atividade apenas contra *E. coli*, um (20%) contra *E. coli* e *S. aureus* e um (20%) contra *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Os isolados que inibiram a *E. coli*, apresentaram o diâmetro dos halos variando de 3 a 32 mm. Contra a *P. aeruginosa*, os halos variaram de 20 a 22 mm, contra a *L. monocytogenes* variaram de 8 a 12 mm e contra o *S. aureus* variaram de 9 a 13 mm (Tabela 10).

Duarte et al. (2013) encontraram atividade antimicrobiana de uma cultura mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* sobre *E. coli*, onde 3,3% (um) formaram halo de 10 mm e 16,6% (cinco) formaram halos de 12 mm de diâmetro. Neto et al. (2005) também demonstraram a ação antagonista de bactérias ácido lácticas e identificaram que *Lactobacillus* spp. foi o gênero que mais proporcionou inibição de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*. Chioda et al., (2007) identificaram a inibição de *E. coli* por todas as cepas de *Lactobacillus* spp. testadas, com halos variando de 9,0 a 15,0 mm de diâmetro. Pereira (2007) avaliou a ação de *Lactobacillus* sp. sobre *E. coli* e identificaram a produção de halos de inibição de 14,75 e 15,0 mm de diâmetro. Alexandre et al. (2002) analisaram a atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo minas artesanal e observaram que das 192 cepas isoladas 25% foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Portanto, alguns resultados encontrados na literatura vão ao encontro dos resultados encontrados neste trabalho. Embora não tenha sido avaliada a natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas culturas lácticas, as atividades inibitórias podem ser justificadas pela difusão de substâncias inibidoras no Agar, impedindo o crescimento das culturas indicadoras (Pereira, 2007). Substâncias

como ácidos orgânicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio podem estar envolvidas.

Figura 2: Halos de inibição das BAL frente a micro-organismos indicadores

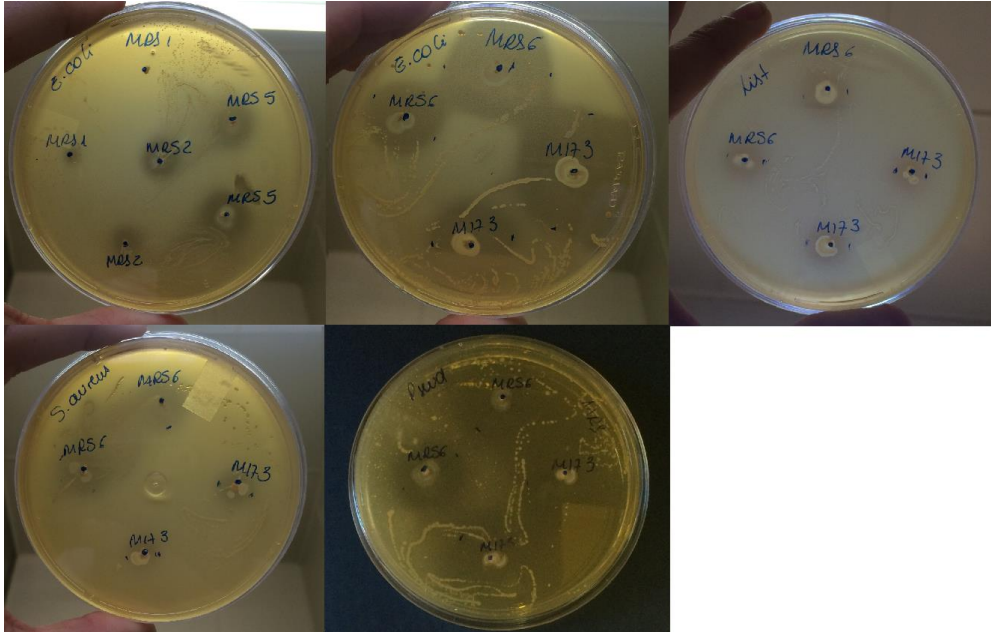


Tabela 10: Diâmetro dos halos de inibição das BAL frente às culturas indicadoras

Culturas	Atividade antimicrobiana (mm)			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
MRS1	3, 3	0	0	0
MRS2	8, 9	0	0	10, 10
MRS5	11, 12	0	8, 10	7, 9
MRS6	20, 23	20, 20	10, 12	12, 13
M173	21, 32	20, 22	9, 11	9, 9

Os resultados deste trabalho demonstraram que a sensibilidade às substâncias produzidas pelas bactérias lácticas e liberadas no meio extracelular varia de acordo com o micro-organismo e com a cepa de bactéria láctica.

#### 4.2.2 Perfil de acidificação

Os resultados para a produção de ácidos em 0, 6, 12, 24 e 48 horas em MRS, leite integral e leite desnatado estão apresentados na Tabela 11. A medição foi feita através da fita de pH (Figura 3) e todos os cinco isolados demonstraram a mesma capacidade de acidificação do meio, mantendo o pH em 4,5 após 6 horas de incubação.

Na fabricação do queijo uma rápida queda do pH é essencial para a coagulação, firmeza da coalhada e controle de micro-organismos indesejáveis. Beresford et al. (2001) afirma que as bactérias *starter* poderiam ser definidas como isolados que produzem ácido suficiente para reduzir o pH do leite a 5 em 3 a 6 horas a 30-37°C. Todas as culturas testadas neste trabalho atenderam a essa exigência.

Tabela 11: Perfil de acidificação das BAL em 0, 6, 12, 24 e 48 horas

Tempo (horas)	Perfil de acidificação (pH)					
	Meio de cultura	MRS1	MRS2	MRS5	MRS6	M173
0	MRS	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
	Leite desnatado	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
	Leite Integral	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
6	MRS	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Leite desnatado	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Leite Integral	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
12	MRS	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Leite desnatado	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Leite Integral	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
24	MRS	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Leite desnatado	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Leite Integral	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
48	MRS	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Leite desnatado	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Leite Integral	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

Figura 3: Resultado da acidificação do meio pelo método da fita de pH



#### 4.2.3 Atividade proteolítica

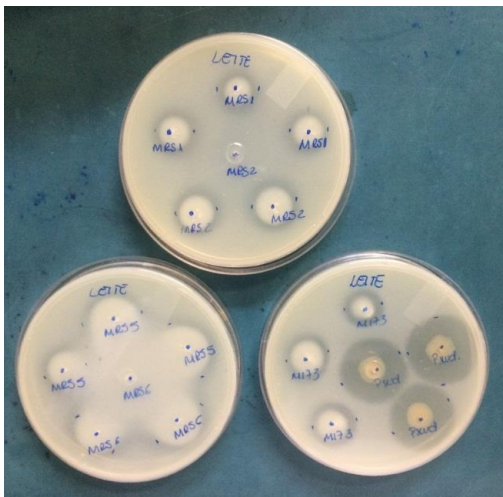
O sabor e a textura do produto final dependem das atividades proteolíticas e lipolíticas das culturas *starter*. Alguns autores como Dovat et al. (1970), Arizcun et al. (1997), Suzzi et al. (2000) e Gonzalez et al. (2010) afirmam que os *Enterococcus* possuem uma fraca atividade proteolítica e lipolítica.

Esta atividade foi avaliada segundo a formação de zonas claras ao redor das culturas. Das cinco culturas testadas, todas causaram proteólise no meio (Figura 4), com algumas variações no diâmetro dos halos entre as BAL (Tabela 12).

Tabela 12: Diâmetro dos halos de proteólise produzidos pelas BAL

Culturas	Halos de proteólise (mm)
MRS1	14, 15, 15
MRS2	16, 17, 0
MRS5	17, 25, 25
MRS6	20, 24, 0
M173	15, 17, 17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	25, 25, 26

Figura 4: Atividade proteolítica das BAL



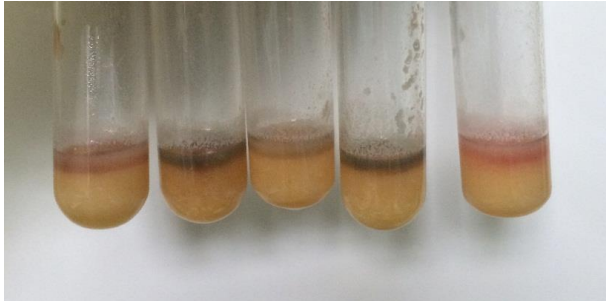
#### 4.2.4 Produção de diacetil

Nem todas as BAL possuem a capacidade de metabolizar o citrato e produzir diacetil. Portanto, esse comportamento pode ser diferente entre espécies e subespécies (RIBEIRO, 2013).

A produção de diacetil foi observada pela formação de um anel vermelho na parte superior do tubo. Duas culturas testadas demonstraram-se positivas para a produção deste composto (Figura 5), ambas classificadas como sendo do gênero *Enterococcus*. Já os *Lactobacillus* não apresentaram potencial para a produção

deste composto. Esta é uma característica importante no que diz respeito a alimentos, pois o diacetil é responsável pela aromatização de alguns produtos.

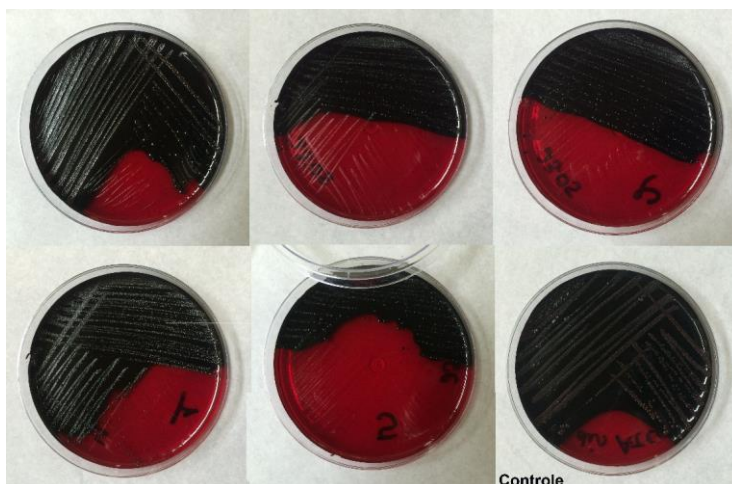
Figura 5: Formação de anel vermelho indicando produção de diacetil



#### 4.2.5 Produção de Exopolissacarídeo

A possível produção de exopolissacarídeos pelas BAL é um recurso importante para torná-las ferramentas úteis para modificar a textura e viscosidade dos produtos lácteos. Neste trabalho, todos os isolados apresentaram colônias pretas e cristalinas, o que indica que foram positivos para a produção de exopolissacarídeo. Essa é uma característica importante a ser considerada para a utilização dessas culturas como culturas *starter*, pois tem apelo considerável para os consumidores.

Figura 6: Produção de exopolissacarídeo pelas BAL





#### 4.2.6 Avaliação da segurança

A detecção de resistência pode ser uma consequência do uso local de agentes antimicrobianos para o tratamento e controle de doenças infecciosas em animais. No entanto, verificou-se que todos os isolados testados apresentaram sensibilidade a muitos antibióticos clinicamente importantes e testados neste trabalho.

A avaliação foi feita através da medição em milímetros dos halos de inibição (Figura 7) e os resultados foram comparados aos valores de referência expostos na Tabela 13. Nenhuma das culturas foi sensível a todos os antibióticos. Todas foram resistentes ou apresentaram resistência intermediária a pelo menos um princípio ativo. 100% das BAL foram sensíveis a amoxicilina + ác. clavulânico, ampicilina, cefalexina, cefotaxima, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina e gentamicina. Os *Enterococcus* MRS1 e MRS2 foram resistentes à rifampicina e os *Lactobacillus* MRS5 e MRS6 demonstraram uma resistência intermediária à rifampicina. Os *Enterococcus* MRS1 e M173 foram resistentes à tetraciclina e o *Lactobacillus* MRS5 foi resistente à vancomicina..

A ausência de resistência a antibióticos em BAL para serem usadas como culturas *starter* é de primordial importância. E, no que diz respeito à segurança, a ausência da produção de gelatinase também. Todos os isolados testados foram negativos para a produção de gelatinase.

Figura 7: Halos de inibição das BAL frente aos antimicrobianos

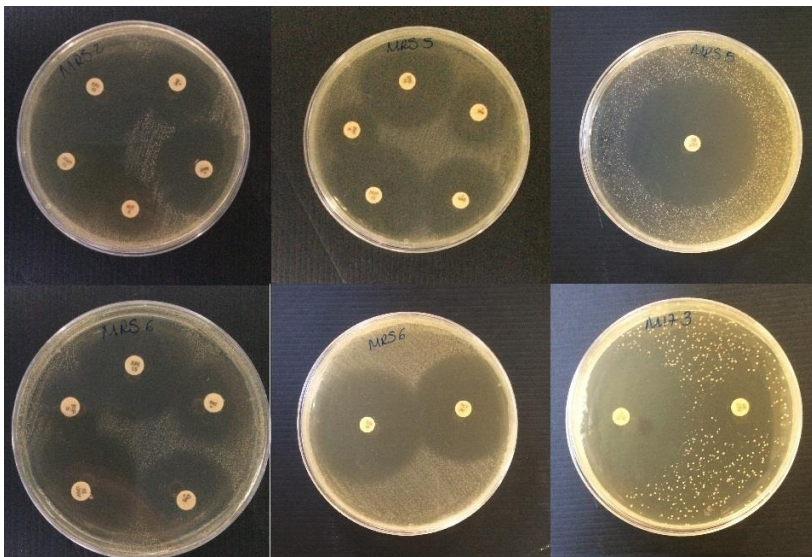




Tabela 13: Avaliação do comportamento das BAL frente aos antimicrobianos

Antibiótico	Antibiograma (mm)					Referência		
	MRS1	MRS2	MRS5	MRS6	M173	R	I	S
Amoxicilina + ác. Clavulânico	62	42	42	38	61	≤13	14-17	≥18
Ampicilina	44	40	38	38	44	≤13	14-16	≥17
Cefalexina	44	36	34	38	30	≤14	15-17	≥18
Cefotaxima	56	40	38	43	44	≤22	23-25	≥26
Cloranfenicol	36	36	30	32	44	≤12	13-17	≥18
Eritromicina	40	40	35	38	38	≤13	14-22	≥23
Estreptomicina	24	26	22	24	17	≤11	12/14	≥15
Gentamicina	30	35	33	32	26	≤12	13-14	≥15
Rifampicina	16	15	17	17	32	≤16	17-19	≥20
Tetraciclina	18	40	49	31	18	≤14	15-18	≥19
Vancomicina	24	26	16	24	30	≤14	15-16	≥17

Fonte: SENSIFAR E MULTIFAR-CEFAR®

#### 4.2.7 Coexistência entre os isolados

Os resultados demonstraram que todos os isolados poderiam coexistir sem que nenhum interferisse na multiplicação do outro (Tabela 14). Este é um fator interessante, pois possibilita a utilização de diferentes culturas em alimentos com características distintas e desejáveis.

Tabela 14: Coexistência entre os isolados

<b>Culturas</b>	<b>MRS1</b>	<b>MRS2</b>	<b>MRS5</b>	<b>MRS6</b>	<b>M173</b>
MRS1		+	+	+	+
MRS2	+		+	+	+
MRS5	+	+		+	+
MRS6	+	+	+		+
M173	+	+	+	+	

## 5 CONCLUSÕES

Ao avaliar todos os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o leite ovino é uma matéria-prima capaz de fornecer culturas lácticas com características de interesse para o uso em alimentos.

As bactérias lácticas avaliadas demonstraram um potencial de crescimento em situações de ambientes hostis, como temperaturas elevadas, meios com alta salinidade e baixos pHs. Essas características são importantes para a utilização dessas culturas na fabricação de alguns produtos como queijos e iogurtes, onde essas variações ocorrem. Além disso, as culturas demonstraram um potencial de atividade antimicrobiana contra os micro-organismos patogênicos e deteriorantes testados, com destaque para MRS6 e M173 que inibiram todos eles. Esta é uma propriedade importante, pois sabe-se que os alimentos podem ser veículos de micro-organismos patogênicos. As propriedades tecnológicas avaliadas forneceram resultados positivos, como produção de exopolissacarídeos, atividade proteolítica e perfil de acidificação. A produção de diacetil foi verificada em apenas duas culturas, MRS1 e M173, fator esse importante para a produção de aroma nos produtos. O perfil de resistência aos antibióticos demonstrou que 100% das culturas testadas foram sensível à maioria dos antimicrobianos de interesse, o que é de primordial importância por razões de segurança, assim como a produção da enzima gelatinase, que foi negativa para todos os isolados. Além disso, ao avaliar a coexistência entre os isolados, não foi observada inibição de nenhuma cultura, o que possibilita a utilização conjuntas das mesmas.

A indústria tem buscado alternativas para suprir a demanda dos consumidores por produtos de maior qualidade, segurança e vida de prateleira prolongada. As bactérias lácticas estudadas demonstram ter potencial para suprir esses quesitos, pois possuem atividades funcionais interessantes para manter ou melhorar as características sensoriais e organolépticas dos alimentos. Mas, para que sejam utilizadas na fabricação de alguns produtos, outros testes com base nos resultados de sua aplicação e na segurança de sua utilização ainda devem ser feitos.

## REFERENCIAS

ABD EL AAL, Salah Fathi Ahmad; AWAD, E. I. Bacteriological quality of raw ewe's and goat's milk, with special reference to foodborne pathogens. **Beni-Suef Veterinary Medical Journal**, Egito, v. 18, n. 2, p. 28-33, 2008.

ABREU, Elisângela de. **Desenvolvimento e caracterização de Frozen Yogurt a partir de iogurte em pó de ovelha**. Erechim: URI, 2014. 56f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Urugai e Missões, Erechim, 2014.

ACURCIO, Leonardo Borges. **Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido-láticas de leite de ovelha**. 2011. 80f. Belo Horizonte: UFMG. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

ADAMS, Martin R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, v.8, p. 227-239, 1997.

ALEXANDRE, D. P. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microorganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 54, n. 4, jul/ago. 2002.

AMMOR, M.S.; FLÓREZ, A.B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, 24, 559–570, 2007.

ARCO - Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. **Padrões Raciais**. Disponível em: <<http://www.arcoovinos.com.br/sitenew/index.asp?pag=padroes.asp>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

ARIZCUN, C.; BARCINA, Y.; TORRE, P. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazábal cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 17-24, 1997.

BARILLET, F.; BOCQUIER, F. Le contexte de production des ovins laitiers en France: principaux objectifs de recherche-développement et conditions de leur mise en oeuvre. **INRA Productions Animales**, Février, 1993.

BENCINI, R. Factors affecting the quality of ewe's milk. In: GREAT LAKES DAIRY SHEEP SYMPOSIUM, 7, 2001, Eau Claire. **Proceedings**. Eau Claire: Wisconsin Sheep Breeders Cooperative, 2001. Disponível em: <<http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/sheepgoat/sgQuality.pdf>>. Acesso em: 07 jul. 2015.

BERESFOR, T.P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, 11, 259–274, 2001.

BOYAZOGLU, J; MORAND-FEHR, P.. Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality: a critical review. **Small Ruminant Research**, 40, p. 1-11, 2001.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. Leite e Derivados, v. 5, nº 25, 1995.

BRASHEARS, M.M.; DURRE, W.A. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during growth and refrigerated storage. **Journal of Food Protection**. v.62, p.1336-1340, 1999.

BRITO, Marcelo Arnt. **Variação dos perfis metabólico, hematológico e lácteo de ovinos leiteiros em confinamento**. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CÂMARA, Sandra Paula de Aguiar e. **Estudo do potencial bioactivo e tecnológicos de bactérias do ácido láctico isoladas de queijo do pico artesanal**. 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2012.

CAMPOS, Licinia de. 2011 **Aspectos benéficos do leite de ovelha e seus derivados**, 12, 2011. Disponível em: <[http://www.casadaovelha.com.br/files/pesquisa\\_tecno\\_cientifica.pdf](http://www.casadaovelha.com.br/files/pesquisa_tecno_cientifica.pdf)>. Acesso em 23 mar. 2015.

CAMPOS, Licinia de. **Queijo e saúde**. 37. 2010. Disponível em <<http://www.queijosnobrasil.com.br/queijo.html>>. Acesso em 01 jul. 2015.

CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, v.13, p.191-200, 2003.

CAVALLI, S.V. et al. **Food Chemistry**, v. 106, p. 997-1003, 2008.

CHANOS, P.; WILLIAMS, D.r. Anti-Listeria bacteriocin-producing bacteria from raw ewe's milk in northern Greece. **Journal Of Applied Microbiology**, Lincoln, p. 757-768. 2011.

CHIODA, T.P. et al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.583-585, mar/abr. 2007.

DE VUYST, L. et al. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, 11, 687–707, 2001.

DORNELLES, Andréia Spanamberg. **Fungos e bactérias em leite de ovelha**. 52 f. Porto Alegre: 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

DOVAT, A.M. et al. Lipolytic and proteolytic activity of enterococci and lactic acid group streptococci isolated from young Cheddar cheese. **Journal of Milk and Food Technology**, 33, 365-372, 1970.

DOYLE, M.P. Antimicrobial resistance: implications for the food system. **Food Science and Food Safety**, 5, 71–137, 2006

DUARTE, M.C.K.H. et al. Ação antagonista de bactérias lácticas frente ao crescimento de estirpe patogênica. **Enciclopédia biosfera**, v.9, N.16; p.25; 2013.

EMEDIATO, Rodrigo Martins de Souza; MAESTÁ, Sirlei Aparecida. **Ovinocultura de leite - uma introdução**. 2007. Disponível em: <<http://m.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/sistemas-de-producao/ovnocultura-de-leite-uma-introducao-39134n.aspx>>. Acesso em: 29 mar. 2015.

EMEDIATO, Rodrigo Martins de Souza et al. Queijo prato de leite de ovelhas alimentadas com dieta contendo gordura protegida. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 1, n. 16, p. 228-238, 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **StatisticsDivision (FAOSTAT)**, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i0680e/i0680e.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2015.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **StatisticsDivision (FAOSTAT)**, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/017/i3138e/i3138e08.pdf>>. Acesso em 22 mar. 2015

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production: live animals, livestock primary, livestock processed; Trade: countries by commodity (imports and exports)**, 2012.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **StatisticsDivision (FAOSTAT)**, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3621e.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2015.

FERREIRA, Maria Izabel Carneiro. **Produção de Leite de Ovelhas**. 2007. Disponível em: <<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=1580>>. Acesso em: 08 abr. 2015.

FRANCIOSI, E. et al. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, 19, 3–11, 2009.

- FORSYTHE, Stephen J. A flora microbiana dos alimentos. In: FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. Cap. 4, p. 109-151.
- FORSYTHE, Stephen J. Flora microbiana e conservação de alimentos. In: FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2013. Cap. 3, p. 143-192.
- FREEMAN, J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative Staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, 42, 872-874, 1989.
- FUERTES, J.A. et al. Parameters of test day milk yield and milk components for dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1300-1307, 1998.
- FURTADO, Múcio Mansur. **Queijos finos maturados por fungos**. São Paulo: Milkbizz, 2003.
- GONZALO, C. et al. Factors influencing variation of test day milk yield, somatic cell count, fat, and protein in dairy sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 6, p.1537-1542, 1994.
- GOETZE, Marguit. **Avaliação da qualidade de leites de ovelha destinados à elaboração de queijos tipo pecorino toscano e feta**. 2010. 54f. Bento Gonçalves: IF, 2010. Trabalho de Conclusão de Curso – IFRS, Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, Instituto Federal de Educação, Bento Gonçalves, 2010.
- GRIEBLER, Letieri. **A ovinocultura leiteira no Brasil**. 2012. Disponível em: <http://www.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/sistemas-de-producao/a-ovinocultura-leiteira-no-brasil-79849n.aspx>. Acesso em: 22 de mar. de 2015
- GONZALEZ, L. et al. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. **Food Microbiology**, 27, 592–597.
- GUO, X.H. et al. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. **Anaerobe**, 16, 321–326, 2010.
- GUTIÉRREZ, Ramón Badía. **Elaboración artesanal de quesos de ovejas**. Montevideo: MGAP – JUNAGRA – UAPAG, 1991. 130p.
- HADIJIGEORGIOU, I. et al. The socio-economics of sheep and goat farming in Greece, and the implications for future rural development. **Lsirdo Bray Conference**, 1998.
- HAENLEIN, G. F. W. **The nutritional value of sheep milk**. 2000. Disponível em: [www.sheepdairying.com/haenlein.htm](http://www.sheepdairying.com/haenlein.htm). Acesso em 07 jul. 2015.
- HAENLEIN, G. F. W. Past, present and future perspectives on small ruminant dairy research. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2097-2115, 2001.

HAENLEIN, G.F.W. About the evolution of goat and sheep milk production. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 3-6, 2007.

HANSEN, Christian. **Maturação de queijos**. Valinhos: Biotec, n. 92. p. 6-10, mar/abr, 2006.

HARBUTT, Juliet. **A complete illustrated guide to the cheeses of the world**. Ed Hermes House, 1999.

HOSSEINI, S. V. et al. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. **Journal of Applied Microbiology**, 1-12, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística .**Produção da Pecuária Municipal**, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística .**Produção da Pecuária Municipal**, 2011. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2011/ppm2011.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf) Acesso em: 22 mar. 2015.

JACK, Ralph W.; TAGG, John R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**., v. 59, p. 171-200, 1995.

JAY, James M.; LOESSNER, Martin J.; **GOLDEN**, David A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. New York: Springer, 2005.

JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, 7, 462-478, 1994.

JOLLY, L. et al. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 82, 367–374, 2002.

JUÁREZ, M.; RAMOS, M. Physicochemical characteristics of goat's milk as distinct from those of cow's milk, 1986. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 202, p. 54-67, 1986.

KHANAL, R. C. e DHIMAN, T.R. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA). **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 3, p. 72-81, 2004.

KING, N. Modification of Voges–Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetyl methyl carbimol plus diacetyl in butter. **Dairy Industries**, 13, 860–866, 1948.

LIMA, Suely Cristina Gomes de. **Efeito da adição de concentrado protéico de soro e leite em pó desnatado na fabricação de iogurte firme**. Campinas: UNICAMP, 2001. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em



Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

LOPES, M.F.S. et al. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, 112, 208–214, 2006.

MACCIOTTA, N.P.; CAPPIO-BORLINO, A., PULINA, G.; Analysis of environmental effects on test day milk yields of Sarda dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2212–2217, 1999.

MACEDO, Livia Nolasco et al. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 28, n. 4, p. 935-942, 2008.

MAGRO, M.L.M. et al. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, v.37, p.59-66, 2000a.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. **International Journal of Food Microbiology**, 105, 281–295, 2005.

NESPOLO, C. R.; TAFFAREL, J. A. S.; BRANDELLI, A. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos durante a produção e maturação do queijo Fascal. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 4, p. 323-328, 2009.

NETO, L.G.G. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, supl. 2, p. 245-250, 2005.

OCHOA-CORDERO, M. A. et al. Milk yield and composition of Rambouillet ewes under intensive management. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 269-274, 2002.

OKSUZTEPE, G.; PATIR, B.; ÇALICIOĞLU, M. Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of savaktulum cheese. **Turkey Journal of Veterinary Animal Science**, v. 29, p. 873-978, 2005.

ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido-lácticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: Isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

OTTO DE SÁ, Cristiane; SÁ, José Luiz de. 2006? **História dos ovinos**. Disponível em: <<http://www.crisa.vet.br/historia.htm>>. Acesso em: 31 mar. 2015

OUWEHAN, C.; Vesterlund, S., 2004. **Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria**. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3 ed., Revised and Expanded. Marcel Dekker, New York, pp. 375-396

PAULINA, G.; BENCINI, R. **Dairy Sheep Nutrition**. 2004. Wallington: CABI Publications, United Kingdom, 222 p. 2004.

PEETERS, R. et al. Milk yield and milk composition of Flemish Miksheep, Suffolk and Texel ewes and their crossbreds. **Small Ruminant Research**, v. 7, n. 4, p. 279-288, 1992.

PELLEGRINI, Luiz Gustavo de. **Caracterização do leite ovino em função do período de lactação**, 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

PELLEGRINI, Luiz Gustavo de et al. Caracterização físico-química e perfil lipídico de queijos produzidos com leite ovino. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 394, p. 11-18, set/out. 2013.

PENNA, C. F. A. M. **Produção e parâmetros de qualidade de leite e queijos de ovelhas Lacaune, Santa Inês e suas mestiças submetidas a dietas elaboradas com soja ou linhaça**. 2011. 155 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Departamento de Zootecnia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

PEREDA, Juan Antonio Ordonez. **Tecnologia de Alimentos – Origem Animal I**. São Paulo: Artmed, 2005. 279 p.

PEREIRA, V.G.; GOMÉZ, R.J.H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Ciências Agrárias**, v.28, n. 2, p. 229-240, abr/jun. 2007.

PERRY, D.B.; MCMAHON, D.J.; OBERG, C.J. Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low-fat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, 80, 799-805, 1997.

PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria-1. Oxygen metabolites and products from catabolism. **Lait**, v. 71, p. 525-541, 1991.

PREIS, Carine. **Desenvolvimento e caracterização de queijo minas curado elaborado com leite de ovelha**. Pinhalzinho: UDESC, 2011. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, 2011.

QUEIJOS NO BRASIL. Disponível em < <http://www.queijosnobrasil.com.br/queijo.html> >. Acesso em: 20 nov. 2009.

RIBEIRO, Suzana. et al. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico Cheese and artisanal cow's milk cheese. **Journal of Applied Microbiology**, 116, 573-585, 2013.

ROHENKOHL, Julio Eduardo et al. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Indicadores Econômicos FEE**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 97-114, 2011.

ROSS, R. Paul; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**. v.79, p. 3-16, 2002.

SALMINEN, Sakari; VON WRIGHT, Atte. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993. 442p.

SALMINEN, Sakari; VON WRIGHT, Atte. OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. 633p.

SANTOS, W.L.M. Aislamento y caracterizacion de una bacteriocinaproducida por *Pediococcus* sp. 347 de origem carnica. 1993, 244f. Tese (Docência Livre). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinária, Madrid, 1993.

SAUERESSIG, Denise. **Leite ovino: produto de alto valor agregado**. 2010. Disponível em: <<http://www.farmpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-de-noticias/leite-ovino-produto-de-alto-valor-agregado-65705n.aspx>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

SELAIVE, A.B.; OSÓRIO, J.C.S. **Produção de ovinos no Brasil**. 1.ed. 2014. São Paulo: Roca, 634 p. 2014.

SENSIFAR E MULTIFAR-CEFAR®, 2013. Disponível em: <[http://www.didaticasp.com.br/arq\\_ext/Multidiscos\\_Antibiograma.pdf](http://www.didaticasp.com.br/arq_ext/Multidiscos_Antibiograma.pdf)>. Acesso em 06 jul. 2015

SIQUEIRA, Edson Ramos de; MAESTÁ, Sirlei Aparecida. **Bases para a produção e perspectivas de mercado do leite ovino**. In: Simpósio Mineiro de Ovinocultura, 2., 2002, Lavras: UFLA, 2002. p.59-78.

SIQUEIRA, Edson Ramos de; EMEDIATO, Rodrigo Martins de Souza. **Qualidade do leite de ovinos**, 2013. Trabalho apresentado no 10. Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, Uberaba, 2013.

SILVA, Maria Fernanda Correia da. **Características do queijo e do leite de ovelhas da raça Bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.)**. 2014. 71f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

SINGH, K.V. et al. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. **Journal of Infectious Diseases**, 178, 1416– 1420, 1998.

SUZZI, G. et al. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicottocaprino). **Journal of Applied Microbiology**, 89, 267–274, 2000.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, 34, S3-S10, 2006.

TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhoek**, 76, 115–137, 1999.

URAZ, G.; SIMSEK, H.; MARAS, Y. The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw milk in various salt concentrations. **International Journal of Dairy Technology** v.54, p.146-150, 2001.

VAUGHAN, E.E.; CAPLICE, E.; LOONEY, R. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.118-123, 1994.

WELMAN, A. D.; MADDOX, I.S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **Trends in Biotechnology**, 21, 269–274, 2003.

WILLIAMS, Alan G.; WITHERS, Susan E.; BANKS, Jean M. Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 17-23, 2000.

ZEN, Sergio de et al. Evolução da caprino e ovinocultura. **Ativos da Pecuária de Caprino e Ovinocultura**, Brasília, v. 1, n. 1, p.1-3, set. 2014. Mensal.