



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DE  
OVELHA E ATIVIDADE ANTAGONISTA DE SUA MICROBIOTA LÁTICA**

**ANNA CAROLINA DA COSTA KOCH**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**  
**DEZEMBRO DE 2014**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DE**  
**OVELHA E ATIVIDADE ANTAGONISTA DE SUA MICROBIOTA LÁTICA**

**ANNA CAROLINA DA COSTA KOCH**

**ORIENTADORA: MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 120D/2014**

**BRASÍLIA/DF**  
**DEZEMBRO DE 2014**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de  
Brasília. Acervo 1019360.

K76c Koch, Anna Carolina da Costa.  
Características físico-químicas e microbiológicas do  
leite de ovelha e atividade antagonista de sua microbiota  
lática / Anna Carolina da Costa Koch. -- 2014.  
xiv, 93 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade  
de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de  
Pós-graduação em Ciências Animais, 2014.

Orientação: Márcia de Aguiar Ferreira.

Inclui bibliografia.

1. Leite - Composição. 2. Leite - Qualidade.  
3. Físico-química. 4. Leite - Microbiologia industrial.  
I. Ferreira, Márcia de Aguiar. II. Título.

CDU 637.1/.3

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DE  
OVELHA E ATIVIDADE ANTAGONISTA DE SUA MICROBIOTA LÁTICA

ANNA CAROLINA DA COSTA KOCH

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS.

APROVADA POR:



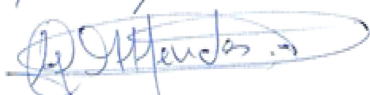
Prof.ª Dr.ª Márcia de Aguiar Ferreira - Universidade de Brasília  
(Orientadora)



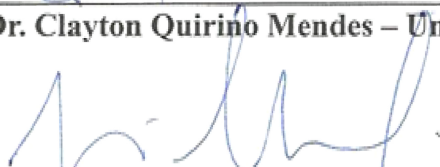
Prof. Dr. Luis Augusto Nero - Universidade Federal de Viçosa



Prof. Dr. Marcos Rodrigues de Mattos - Universidade Federal de Lavras



Prof. Dr. Clayton Quirino Mendes - Universidade de Brasília



Prof. Dr. Sergio Lúcio Salomon Cabral Filho - Universidade de Brasília

BRASÍLIA/DF, 16 de dezembro de 2014.

*Dedico aos meus pais Fátima e Divino, exemplos de  
honestidade e que tão dignamente me  
ensinaram a importância da família.*

*Ao amor da minha vida,  
Fábio Koch, pelo incentivo e apoio  
em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao longo de quatro anos de doutorado, são muitas as pessoas que colaboraram, e a elas espero conseguir transmitir toda a minha gratidão.

A Deus acima de tudo, por permitir-me vencer mais esta jornada, dando-me força e saúde.

Aos meus pais por todo apoio, educação e incentivo que sempre me prestaram, durante todos os momentos de minha vida.

Ao meu marido Fábio por compartilhar comigo seu enorme amor, seu carinho, seu tempo, sua fortaleza, sua paciência. Obrigada por aguentar meus momentos ausentes, obrigada por compartilhar sucessos e fracassos sempre juntos.

Aos meus irmãos, Dani e Eduardo, meus cunhados Inácio, Kátia e Fran e sobrinhos Pedro e Rafa, que sempre me incentivaram nesta trajetória, além de estarem sempre presentes em minha vida mesmo com a distância que nos separa.

À minha vó Terezinha, vô Dé e vô João, pelo carinho e por saber compreender os constantes momentos de ausência.

À minha orientadora Márcia, que confiou no meu trabalho, dando-me a oportunidade de realizar este projeto. Agradeço pela credibilidade e paciência que sempre teve na orientação desta pesquisa e pela convivência amiga.

Aos amigos do LABLEITE Manu, Jaque e Loiane pela valiosa colaboração nas análises laboratoriais, me auxiliando imensamente na organização dos materiais utilizados. E pelas conversas descontraídas nos intervalos.

À Associação de Ovinocultores, Sindicato dos Criadores de Ovinos e Caprinos do DF e EMATER-DF por disponibilizar o mapeamento dos ovinocultores da região. A todos os ovinocultores, Fazenda Água Limpa-UnB e IFB-Campus Planaltina pela credibilidade e disponibilidade, permitindo a coleta de todas as amostras utilizadas na execução deste trabalho, e aos seus colaboradores pelo auxílio na contenção dos animais.

Às amigas Alice e Karol pela grande amizade e carinho que sempre demonstraram desde a graduação, sempre me fazendo acreditar nas possibilidades de sucesso.

Ao prof. Luis Augusto Nero pela valiosa contribuição na realização dessa pesquisa e aos colegas do InsPOA-UFV que me ajudaram na realização das análises de identificação e atividade antimicrobiana das bactérias ácido lácticas, em especial Anderson e Valéria. Muito obrigada pela ajuda de vocês!

Ao Instituto Federal de Brasília e aos amigos Caio, Bruno, Ronaldo, Adley, Sílvia, José Luis, Roberta, Larissa, Gustavo, Lidiane, Marcelo, Luciana e Júlia pelo grande apoio e compreensão nos momentos de ausência na instituição, durante o período de coletas e análises laboratoriais.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da UnB pela oportunidade do ingresso no curso de doutorado e por ter contribuído imensamente para meu crescimento profissional.

Muito obrigada!

## ÍNDICE

RESUMO .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES .....	xiv
CAPÍTULO 1 .....	1
1 INTRODUÇÃO .....	2
1.1 Problemática e Relevância .....	4
1.2 Objetivos .....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	6
2.1 Contexto atual .....	6
2.2 Composição do leite ovino .....	7
2.3 Produção do leite ovino no Brasil e no mundo .....	12
2.4 Potencial tecnológico do leite ovino .....	13
2.5 Fatores que interferem na composição do leite ovino .....	14
2.6 Características físicas do leite ovino .....	17
2.7 Microbiota do leite .....	18
2.8 Qualidade do leite ovino .....	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
CAPÍTULO 2 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DE OVELHA .....	36
RESUMO .....	37
1 INTRODUÇÃO .....	39
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
2.1 Área de estudo e coleta de amostras .....	41
2.2 Análises físico-químicas .....	42
2.3 Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene .....	42
2.4 Pesquisa de micro-organismos patogênicos .....	42
2.5 Análise dos dados .....	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E POTENCIAL ANTAGONISTA DA MICROBIOTA LÁTICA AUTÓCTONE DE LEITE DE OVELHA .....	55
RESUMO .....	56
1 INTRODUÇÃO .....	58
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	60
2.1 Coleta de amostras .....	60
2.2 Enumeração e isolamento de bactérias ácido lácticas .....	60
2.3 Identificação genotípica .....	61
2.4 Atividade antimicrobiana .....	62
2.5 Análise dos dados .....	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
4 CONCLUSÕES .....	74
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
CAPÍTULO 4 .....	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	82
ANEXOS .....	83



## RESUMO

### CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DE OVELHA E ATIVIDADE ANTAGONISTA DE SUA MICROBIOTA LÁTICA

Anna Carolina da Costa Koch<sup>1</sup>, Márcia de Aguiar Ferreira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, <sup>2</sup>Laboratório de Análise de Leite e Derivados - UnB.

A presente pesquisa avaliou a qualidade do leite de ovelhas criadas no Distrito Federal com o objetivo de determinar a sua qualidade e potencial tecnológico. Foram coletadas 126 amostras de leite cru diretamente da glândula mamária de ovelhas, das raças Santa Inês, Dorper e ovelhas leiteiras East Friesian e suas mestiças (EF x SI) em 15 propriedades rurais, que foram submetidas à análises das características físico-químicas (pH, acidez Dornic, densidade, crioscopia, gordura, sólidos não gordurosos, proteína e lactose), microbiológica por meio da enumeração de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT) e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e detecção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.. A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de leite foi realizada pela enumeração, identificação e caracterização da atividade antimicrobiana de BAL. No total 78 isolados foi testado quanto ao potencial antagonista frente a quatro cepas de *L. monocytogenes*, quatro cepas *S. aureus* e uma cepa de *Lactobacillus sakei*; em seguida, com base nos perfis dos produtos de reação de Rep-PCR esses isolados foram submetidos ao sequenciamento genético. Adicionalmente foi avaliada a atividade bacteriocinogênica dos isolados. Foram verificados valores médios de pH, densidade e acidez Dornic, respectivamente de 6,69; 1,039 g/mL e 21,16 °D, e o índice crioscópico médio foi de -0,567 °H. Quanto aos principais componentes os teores médios obtidos foram: de 5,41% de gordura; 11,17% de sólidos não gordurosos; 5,04% de proteína e 5,25% de lactose. Em relação ao perfil microbiológico observou-se média de  $5,6 \times 10^4$  UFC/mL para AM,  $1,15 \times 10^2$  UFC/mL para CT; de 14,5 UFC/mL para *E. coli* e de 11,5 UFC/mL para *S. aureus*. Não foi observado *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* nas amostras analisadas. Os resultados demonstraram ainda desenvolvimento de BAL em 80,2% (101/126) das amostras analisadas, com contagem média de  $2,25 \times 10^3$  UFC/mL de leite. O perfil antagonista dos isolados testados demonstrou ampla atividade contra *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 12598 e *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 537. O gênero *Lactococcus* apresentou maior atividade antimicrobiana contra *S. aureus* comparada à *L. monocytogenes*. O sequenciamento do gene 16S rRNA identificou 32 isolados como *Enterococcus* spp.; 33 *L. lactis* e um *L. garvieae*; 10 isolados como *Pediococcus pentosaceus* e dois isolados de *Streptococcus salivarius*. Nenhum isolado apresentou produção de bacteriocinas, sugerindo que a atividade antagonista possa estar

relacionada à produção de outras substâncias. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o leite de ovelhas criadas no DF, mesmo quando proveniente de animais de raças não especializadas, apresenta características físico-químicas, microbiológicas e diversidade de BAL, que conferem ao produto qualidade para o seu aproveitamento tecnológico na produção de queijos e outros derivados.

**Palavras-chave:** antagonismo, bactérias ácido lácticas, composição do leite, microorganismos, Petrifilm<sup>TM</sup>

## ABSTRACT

### PHYSICO-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SHEEP MILK AND ANTAGONIST ACTIVITY OF ITS LACTIC MICROBIOTA

Anna Carolina da Costa Koch<sup>1</sup>, Márcia de Aguiar Ferreira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, DF, <sup>2</sup>Laboratory of Milk and Dairy Products Analysis - UnB.

This research evaluated the quality of the sheep milk raised on the Distrito Federal. One hundred and twenty-six (126) samples of raw milk directly from mammary glands of sheep were collected in fifteen different properties, of the following sheep breeds: Santa Inês (SI), Dorper, and the East Friesian dairy sheeps and its mixes. Their physico-chemical characteristics were analyzed (pH, Dornic acidity, density, freezing point, fat levels, non-fatty solids, protein, and lactose). The microbiological quality of the product was evaluated by enumeration of the microorganisms that indicate safety, by counting of aerobic mesophiles (AM), total coliforms (CT), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and also *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.. The microbial activity of the milk was measured by enumeration, identification and characterization of the antimicrobial LAB activity. 78 isolated LAB was tested for its antagonist potential against four strains of *L. monocytogenes*, four strains of *S. aureus* and one strain of *Lactobacillus sakei*; then, based on the profiles of the reaction products of Rep-PCR, these isolated were submitted to genetic sequencing. The bacteriocinogenic activity of these isolated was also analyzed. The average results of physico-chemical characteristics were: pH of 6.69; density of 1.039 g/mL, Dornic acidity of 21.16°D, and freezing point of -0.567°H. For the main components the average levels were 5.41% for fat, 11.17% non-fat solids, 5.04% protein and 5.25% for lactose. Regarding the microbiologic profile was observed average values of  $5.6 \times 10^4$  CFU/mL to AM,  $11.5 \times 10^2$  CFU/mL to CT; 14.5 CFU/mL to *E. coli* and 11.5 CFU/mL to *S. aureus*. *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. were not detected in any sample. The results also identified BAL development in 80.2% (101/126) of the analysed samples, with a count of  $2.25 \times 10^3$  UFC/mL of milk. The antagonist profile of the samples was confirmed with wide activity against *S. aureus* ATCC 25923 and ATCC 12598 and *L. monocytogenes* ATCC 7644 and 537. *Lactococcus* spp. showed the higher microbial activity against *S. aureus* compared to *L. monocytogenes*. The genetic sequencing identified 32 isolated as *Enterococcus* spp.; 33 *Latococcus lactis* and one *Lactococcus garvieae*; 10 isolated as *Pediococcus pentosaceus* and two isolated *Streptococcus salivarius*. No isolated showed production of bacteriocins, suggesting that the antagonist activity might be related to the production of other substances. Considering the results, the conclusion is that the sheep milk in the DF, even when originated from non-specialized races, presents physico-chemical and microbiological characteristics wich gives to

the product enough quality and technological potential for the its technological use in the production of cheese and other dairy products.

**Keywords:** antagonism, lactic acid bacteria, milk composition, microorganisms, Petrifilm<sup>TM</sup>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- |           |   |    |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Composição média e características físicas dos leites caprino, ovino e bovino.                                    | 8  |
| Tabela 2. | Composição físico-química do leite de ovelhas das raças Santa Inês, Bergamácia e mestiças (Santa Inês x Lacaune). | 15 |

### CAPÍTULO 2

- |           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabela 1. | Valores obtidos nas análises das características físico-químicas de leite de ovelhas de rebanhos do Distrito Federal.                          | 44 |
| Tabela 2. | Valores médios obtidos nas análises físico-químicas de amostras de leite de ovelhas de acordo com o tipo de exploração.                        | 46 |
| Tabela 3. | Enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênica e sanitária em amostras de leite de ovelhas de rebanhos do Distrito Federal. | 47 |

### CAPÍTULO 3

- |           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabela 1. | Micro-organismos alvo utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de ovelhas.  | 62 |
| Tabela 2. | Resultados da enumeração de bactérias ácido lácticas em amostras de leite ovino cru, coletadas de ovelhas de rebanhos do Distrito Federal.   | 65 |
| Tabela 3. | Identificação dos isolados de BAL (n=78) por sequenciamento do gene 16S rRNA.  | 68 |
| Tabela 4. | Frequências de inibição dos diferentes gêneros de BAL isoladas de leite ovino com atividade antagonista contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Lactobacillus sakei</i> . | 71 |

### ANEXOS

- |           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabela 1. | Resultados obtidos nas análises para determinação do perfil físico-químico de leite ovino de rebanhos do Distrito Federal  | 84 |
| Tabela 2. | Contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> , aeróbios mesófilos, coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> e Bactérias Ácido Lácticas (BAL) em amostras de leite cru ovino coletadas de rebanhos do Distrito Federal.                        | 87 |
| Tabela 3. | Diâmetros dos halos de inibição (mm) verificados no teste de antagonismo das culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de leite ovino contra <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> . | 90 |

**LISTA DE FIGURAS****CAPÍTULO 3**

- Figura 1. Dendrograma gerado após a análise de impressões Rep-PCR das culturas de BAL isoladas de amostras de leite ovino cru e sua identificação genotípica. 67
- Figura 2. Produto de PCR do gene 16S rRNA evidenciados por eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando-se primers P1V1 e P4V3 (M: marcador de 100 pb; N: controle negativo). 68

**ANEXOS**

- Figura 1. Perfis de reação de Rep-PCR evidenciados em eletroforese em gel de agarose a 2%, das culturas de bactérias ácido lácticas isoladas do leite cru de ovelhas (M: marcador de 1 Kb DNA). 92
- Figura 2. Perfis de reação de Rep-PCR evidenciados em eletroforese em gel de agarose a 2%, das culturas de bactérias ácido lácticas isoladas do leite cru de ovelhas (M: marcador de 1 Kb DNA). 93

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AM	aeróbios mesófilos
AT	acidez titulável
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (cultura de coleção tipo americano)
BAL	bactérias ácido láticas
BIOMOL	Laboratório de Biologia Molecular
Ca	cálcio
CBT	contagem bacteriana total
CLA	ácido linoleico conjugado
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CT	coliformes totais
D	densidade
DF	Distrito Federal
DTA	doenças transmitidas por alimentos
DP	Dorper
EF	East Friesian
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division</i>
FAV	Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
g	grama
GRAS	reconhecido como seguro
h	horas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	índice crioscópico
InsPOA	Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
K	potássio
kg	quilograma
l	litros
L	Lacaune
LABLEITE	Laboratório de Análises de Leite e Derivados
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	miligrama
Mg	magnésio
MG	Minas Gerais
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimol
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
MS	Mato Grosso do Sul
Na	sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
P	fósforo
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
pMol	picomol
rRNA	RNA ribossomal
RS	Rio Grande do Sul

s	segundos
S	enxofre
SI	Santa Inês
SNG	sólidos não gordurosos
ST	sólidos totais
TBE	Tris/Borato/EDTA
TSA	Ágar Trypticase de Soja
TSB	Caldo Trypticase de Soja
UA	unidade arbitrária
UFC	unidade formadora de colônia
UI	unidade internacional
UnB	Universidade de Brasília
UFV	Universidade Federal de Viçosa
V	volt
v/v	volume por volume
YE	extrato de levedura
°C	graus Celsius
°D	graus Dornic
°H	graus Hortvet
μL	microlitro
μg	micrograma
μm	micrômetro



## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura é vista mundialmente, e particularmente no Brasil, como atividade fornecedora, tradicionalmente, de lã e de carne. Em virtude da intensificação da ovinocultura de corte, com mudanças no sistema de criação de extensivo para intensivo, observou-se aumento no interesse de pesquisas sobre a produção e composição do leite de ovelha. Além de ser a principal fonte de nutrientes para os cordeiros durante as primeiras semanas de vida, o leite de ovelha e, principalmente, os seus derivados, encontram ampla oportunidade de mercado (Ferreira, 2007).

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division* (FAOSTAT, 2012) o rebanho ovino situa-se em quarto lugar entre as espécies produtoras de leite do mundo, com produção anual aproximada de 10 milhões de toneladas, o que representa 1,3% da produção total de leite.

Atualmente, ainda verifica-se oferta relativamente baixa de leite ovino na produção total de leites no Brasil, entretanto constata-se perspectiva de crescimento do consumo de queijos, o que estimula o seu incremento (Rohenkohl et al., 2011). A criação de ovelhas de aptidão leiteira tem ganhado cada vez mais espaço entre os ovinocultores, por este leite apresentar valor nutricional e comercial superior, com elevados teores de sólidos totais (ST) quando comparados ao leite de vaca e de cabra, resultando em melhor rendimento na produção de queijos e de outros derivados lácteos. Os ST representam a soma dos macronutrientes de maior interesse econômico como as proteínas e as gorduras, além da lactose e sais minerais (Boyazoglu & Morand-Fehr, 2001).

A alta demanda para produtos lácteos tradicionais e/ou artesanais cria excelentes oportunidades para pequenos e médios produtores, que podem se beneficiar das características específicas do leite de ovelha para produzir queijos especiais, iogurtes e outros derivados lácteos (Pandya & Ghodke, 2007; Pellegrini, 2012). Ovinocultores da região Sul e

Sudeste estão se especializando no setor leiteiro para atender a esse promissor nicho de mercado, os queijos de origem ovina. Entretanto, a produção de derivados do leite, independentemente da espécie de origem, somente se configura em atividade lucrativa quando a busca pela qualidade é constante.

A qualidade do leite se define sobre os parâmetros de composição, uma mistura complexa, nutritiva e estável de gordura, proteínas e outros elementos sólidos, que se encontram suspensos em água. Além destes parâmetros, tem-se o aspecto higiênico, o *status* sanitário do rebanho, a presença de micro-organismos e resíduos contaminantes químicos ou físicos, entre outros fatores.

Neste contexto, pesquisas devem ser desenvolvidas para caracterizar a qualidade e segurança microbiológica do leite de ovelha, bem como a avaliação do potencial tecnológico deste leite. A identificação da microbiota láctica natural e sua atividade antimicrobiana contribuem para elucidar o conhecimento sobre o leite ovino e incrementar a produção e a industrialização desse tipo de leite no Brasil.

## 1.1 Problemática e Relevância

Ao considerar que o leite de ovelha apresenta em sua composição físico-química valores superiores para macro e micronutrientes em relação aos leites de vaca e de cabra, faz-se necessário, gerar mais resultados de pesquisas a respeito deste tipo de leite, que forneçam indicadores, capazes de ampliar a segurança microbiológica, já que no Brasil existe um potencial latente para a produção e processamento do leite ovino.

Existe a necessidade de estabelecer o perfil de qualidade e de manter um controle rigoroso na produção, particularmente em termos microbiológicos, de forma a garantir a inocuidade do produto. A principal forma de identificar esses problemas é pela pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene, que permitem a caracterização das condições de produção e a averiguação dos efeitos de procedimentos corretivos. Em associação, a pesquisa de patógenos no leite de origem ovina tem uma importância significativa para garantia da segurança desse produto e de seus derivados.

Em complementação ao estudo de qualidade e segurança microbiológica do leite de ovelha, a presente proposta visa também à caracterização do potencial antimicrobiano de bactérias ácido lácticas (BAL) naturalmente presentes nesse produto contra micro-organismos patogênicos. A caracterização e identificação de culturas de BAL com esse potencial têm um apresenta especial interesse na indústria de alimentos para serem utilizadas como ferramentas de segurança alimentar e bioconservação, uma vez que, dependendo das espécies identificadas, podem apresentar efeito antimicrobiano amplo contra patógenos e micro-organismos deteriorantes. A utilização dessas culturas em leite de ovelha e seus derivados atende às expectativas do consumidor em adquirir alimentos saudáveis e naturais.

Tendo em vista poucos trabalhos sobre este tema, essa pesquisa busca gerar dados que possam contribuir para o estabelecimento de uma base dos padrões de qualidade microbiológica do leite ovino.

## 1.2 Objetivos

### Objetivo Geral

Avaliar o perfil físico-químico e microbiológico e caracterizar a microbiota láctica autóctone do leite de ovelhas de rebanhos do Distrito Federal.

### Objetivos específicos

- Caracterizar a composição físico-química do leite de ovelha da região;
- Avaliar a presença de micro-organismos indicadores da qualidade higiênica e sanitária do leite ovino;
- Detectar a presença de micro-organismos patogênicos *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em leite ovino;
- Determinar a diversidade genética da microbiota láctica autóctone;
- Identificar o potencial antagonista da microbiota láctica em relação aos micro-organismos *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar a atividade bacteriocinogênica das culturas de bactérias ácido lácticas antagonistas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Contexto atual

A produção de leite de ovelhas tem sido vista como uma alternativa sustentável, destacando-se como fatores favoráveis ao desenvolvimento da ovinocultura leiteira, o baixo investimento inicial e de fácil adoção pela mão de obra familiar, podendo melhorar a qualidade de vida dos pequenos e médios produtores rurais, assim como a existência de mercados crescentes para os produtos oriundos da ovinocultura (Souza et al., 2005; Pandya & Ghodke, 2007; Pellegrini, 2012).

Mais concentrado que os leites de vaca e de cabra, o leite de ovelha é indicado para a fabricação de queijos com aromas e sabores especiais, famosos e de alto valor comercial no mundo inteiro (Park et al., 2007). Raramente é consumido *in natura*, sendo a maior parte do leite ovino transformada em queijos e, em menor escala, em iogurte (Haenlein & Wendorff, 2006). A utilização desta valiosa matéria prima para a fabricação de derivados do leite pode aumentar o retorno financeiro do ovinocultor (Souza et al., 2005; Pandya & Ghodke, 2007; Pellegrini, 2012).

Segundo Rohenkohl et al. (2011) a fabricação de produtos lácteos de ovinos e de caprinos é incipiente no Brasil, no entanto, há uma oportunidade de expansão do sistema de mercado desse tipo de leite atrelada ao potencial de ampliação do consumo de queijos. Celia et al. (2012) destacaram que o consumo de produtos derivados de leites não bovinos no Brasil, em especial na região Sul, está relacionado, principalmente, ao consumo de diferentes tipos de queijos e seus consumidores estão dispostos a investir mais em produtos de qualidade, saborosos e nutritivos.

De acordo com os relatos de Novello & Preis (2012) a ovinocultura leiteira, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, está em crescimento nos últimos anos, sendo que a exploração de leite para a fabricação de queijos finos e iogurte tornou-se negócio promissor.

## 2.2 Composição do leite ovino

Campos (2011) relatou que os teores de proteína, gordura, cálcio e outros minerais no leite de ovelha são superiores quando comparados aos de outros animais como vaca, búfala, cabra e, inclusive, ao leite humano. Apresenta composição de nutrientes diferenciada dos demais leites, com valores que o tornam altamente nutritivo e propício à transformação industrial, garantindo características bastante peculiares, com sabor suave e ligeiramente adocicado.

Em relação à composição do leite de ovelhas, notam-se grandes variações na composição química de acordo com a época do ano, em virtude da sazonalidade na concentração dos partos (Haenlein & Wendorff, 2006). No início da lactação os teores de gordura, proteína e sólidos totais são mais elevados, assim como no final da lactação. Durante o pico de produção, no entanto, o teor desses componentes diminui (Bencini, 2001).

### Sólidos totais

Denomina-se por matéria seca total ou sólidos totais (ST), todos os componentes do leite exceto a água. Assim, quanto maiores os teores destes, maiores serão os valores para ST (Tronco, 2003). Guerra et al. (2008) relataram que quanto maior a quantidade de sólidos totais, melhor será o rendimento deste leite para a indústria de laticínios.

Estudos recentes demonstram que valores médios de ST de leite de ovelha variam de 15,23% (Zafalon et al., 2010b) até 19,34% (Fava, 2012). Pellegrini et al. (2012) determinaram que as médias das características composicionais do leite de ovelhas são significativamente maiores que o de leite de vaca ou de cabra, com teores de ST, respectivamente, 16,79%; 12,02% e 11,63%. As diferenças das propriedades físico-químicas do leite das diferentes espécies são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição média e características físicas dos leites caprino, ovino e bovino.

Parâmetros	Tipo de leite		
	Leite de cabra	Leite de ovelha	Leite de vaca
Gordura (%)	3,8	7,9	3,6
Sólidos não gordurosos (%)	8,9	12,0	9,0
Lactose (%)	4,1	4,9	4,7
Proteína (%)	3,4	6,2	3,2
Caseína (%)	2,4	6,2	2,6
Albumina, globulina (%)	0,6	1,0	0,6
Cinzas	0,6	0,9	0,7
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,029 -1,039	1,034 -1,038	1,023 -1,039
Índice crioscópico (- °C)	0,540 - 0,573	0,570	0,530 - 0,570
Acidez em °D <sup>1</sup>	14 - 23	22 - 25	15 -18
pH	6,50 - 6,80	6,51 - 6,85	6,65 - 6,71

<sup>1</sup>°D: graus Dornic

Fonte: Park et al. (2007) adaptado.

## Proteínas

A proteína da fração coagulável do leite é denominada de caseína e se apresenta na forma de um complexo micelar de sal de cálcio coloidal, sendo considerada a mais importante proteína do leite, principalmente do ponto de vista nutricional e tecnológico. O complexo micelar de caseína é constituído por submicelas de  $\alpha S_1$  caseína,  $\alpha S_2$  caseína,  $\beta$  caseína e  $\kappa$ -caseína, e compõem cerca de 80% de todas as proteínas do leite de ovelhas saudáveis (Haenlein & Wendorff, 2006).

Outro grupo é o das proteínas do soro, responsáveis por aproximadamente 17% a 22% do total de proteínas, sendo as principais a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactalbumina. Em menores concentrações estão presentes as imunoglobulinas, a albumina sérica, a lactoferrina e peptídeos de baixo peso molecular (Park et al., 2007). As formas proteicas encontradas no soro de leite são facilmente digestíveis, e o leite de ovelha é mais rico nestas proteínas que o leite de vaca ou de cabra, tornando-o de mais fácil digestão (Campos, 2011).

O teor médio de proteína no leite de ovelha é 6,2%, maior do que no leite de cabra e de vaca, que apresentam teores médios de 3,4% e 3,2%, respectivamente (Park et al., 2007). O teor de proteína pode variar amplamente entre as espécies sendo influenciado pela



raça, estágio de lactação, alimentação, clima, época de parição e saúde do úbere (Haenlein & Wendorff, 2006; Fava, 2012).

Além do valor de proteína do leite de ovelha ser superior aos de outras espécies, é um elemento considerado de alto valor biológico, sendo superior ao leite de vaca no fornecimento de todos os aminoácidos essenciais. Dois copos de leite de ovelha (500 g) pode fornecer os requisitos diários de dieta de oito dos 10 aminoácidos essenciais (Haenlein & Wendorff, 2006).

A condição de melhor rendimento queijeiro está intimamente relacionada com o teor proteico original, fazendo com que este nutriente seja o de maior interesse econômico na indústria de laticínios (Albuquerque, 2012).

## **Gordura**

A gordura é responsável por boa parte da consistência, do valor nutritivo e econômico do leite. O componente lipídico do leite é formado por uma complexa mistura, composta por várias classes, incluindo monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídeos e esteroides. A gordura é produzida nas células epiteliais secretoras da glândula mamária, predominando os triglicerídeos (98%), que consistem em três moléculas de ácidos graxos ligadas por uma de glicerol (Cunningham, 2004).

O teor médio de gordura no leite de ovelha é superior ao leite de vaca ou de cabra, apresentando médias internacionais de 7,9%; 3,6% e 3,8%, respectivamente (Park et al., 2007) e no Brasil, de 7,21%; 3,65% e 3,94% (Pellegrini et al., 2012). Contudo, segundo Furtado (2003), há diferenças na distribuição dos seus constituintes lipídicos, apresentando maior quantidade de determinados ácidos graxos de cadeia média, como o caproico (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) que auxilia na diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesterol LDL, refletindo diretamente em benefícios à saúde humana (Campos, 2011).

O leite de ovelha não possui caroteno em sua gordura, o que lhe proporciona uma brancura típica (Furtado, 2003). Os lipídeos se apresentam em glóbulos de pequeno diâmetro, com média menor que 3 µm, inferior ao tamanho dos glóbulos no leite de vaca, que apresentam, em média, diâmetro de 4 µm (Haenlein & Wendorff, 2006; Park et al., 2007; Costa et al., 2009). Considerado naturalmente homogeneizado, o que facilita o processo de digestão e aumenta a eficiência no metabolismo de lipídios, quando comparado com a gordura do leite de vaca. Pode ser congelado sem que ocorra separação de óleo e fases por quebra dos glóbulos de gordura. Possui maior teor de ácido linoleico conjugado (CLA), que é um ácido graxo amplamente pesquisado por suas propriedades anticarcinogênicas e capacidade de

reduzir a gordura corporal enquanto aumenta, concomitantemente, a massa muscular. Outros efeitos benéficos atribuídos ao consumo do CLA são a proteção contra a aterosclerose, a caquexia e o desenvolvimento de diabetes (Albuquerque, 2012).

Fava (2012) analisou a composição do leite de ovelhas da raça Lacaune, criadas na região Sul do país, e também comprovou o seu alto teor de gordura, observando porcentagem média de 8,10%. E, conforme Haenlein & Wendorff (2006), o sabor dos queijos é muito influenciado pela hidrólise da gordura durante a maturação, o leite de ovelha por conter altos teores deste componente, resulta em queijos mais saborosos.

### **Lactose**

A lactose é o principal açúcar do leite e importante fonte de energia para os neonatos, e também, é o principal substrato para as bactérias ácido lácticas que participam da transformação do leite em derivados, como queijos e leites fermentados (Brito, 2004). A lactose é considerada um importante constituinte do leite por ser responsável pela manutenção da pressão osmótica na glândula mamária e pelo volume de leite produzido pelas células alveolares. Apresenta variações em seus teores nos diferentes estágios de lactação, ocorrendo aumento no pico em relação ao início e ao final da lactação (Hurley, 2002).

Comparado com o leite de vaca, o conteúdo de lactose no leite de ovelha apresenta-se praticamente nos mesmos níveis. Isto faz com que o teor de lactose no leite dessa espécie represente menor proporção dentro dos sólidos totais, constituindo 22-27% desses, sendo 33-40% no leite de vaca (Raynal-Ljutovac et al., 2008). Mayer & Fiechter (2012) encontraram teores semelhantes de lactose em leite de ovelha (4,64%) e cabra (4,32%). Zimmermann et al. (2009), estudando ovelhas Suffolk encontraram valor médio de 4,15% de lactose, enquanto Corrêa (2004) avaliando ovelhas Corriedale, obteve média de 5,3%. Esses valores enquadram-se dentro dos valores médios encontrados por Cordero et al. (2002), que determinaram variação de 4,4 a 5,5% de lactose para animais de diferentes raças e ambientes.

### **Minerais**

Os minerais são importantes para o crescimento, o desenvolvimento e a manutenção da saúde dos tecidos corporais (Morgano et al., 2005), pois desempenham funções essenciais para o organismo dos animais e do homem. Participam como componentes estruturais dos tecidos corporais, atuam nos tecidos e fluidos corporais como eletrólitos para manutenção do equilíbrio ácido-básico, da pressão osmótica e da permeabilidade das

membranas celulares e funcionam como ativadores de processos enzimáticos ou como integrantes da estrutura de vitaminas (Tokarnia et al., 2000).

O perfil de minerais do leite de ovelha pode ser uma ferramenta apropriada para avaliar o *status* nutricional dos minerais do leite, estando intimamente relacionado com a fabricação de produtos lácteos de elevada composição nutricional (Pellegrini, 2012).

De acordo com Mahaut et al. (2000) o leite de ovelha é mais rico em sais minerais que o leite de vaca, contendo aproximadamente 0,9% de minerais totais ou cinzas, teor superior quando comparados aos 0,7% no leite de vaca. Os níveis de cálcio, fósforo, magnésio, zinco e cobre são maiores no leite ovino que no bovino, e menores em relação aos níveis de potássio e sódio.

O teor de minerais do leite ovino pode ser influenciado por vários fatores como estágio da lactação, estado nutricional do animal, fatores genéticos e do ambiente devido às diferenças em alimentação e variações sazonais (Park et al., 2007). Pellegrini (2012) relatou que Ca, S, P, Mg, K e Na, presentes no leite de ovelha, não apresentaram um padrão de variação entre a 1ª e 10ª semana de lactação em ovelhas ½ sangue Lacaune e ovelhas cruza Ile de France x Texel.

Ivanova et al. (2011) obtiveram teores de Ca e P no leite de ovelhas da raça East-Friesian. Os valores médios foram 150 mg de cálcio e 125,78 mg de fósforo/100g de leite, com relação Ca: P de 1,19:1,05. Nos resultados de Pellegrini (2012), a proporção média de Ca:P foi de 1,44:1, descrita como proporção ideal para o crescimento e formação dos ossos.

De forma geral, o leite de ovelha apresenta quase todos os minerais necessários ao ser humano, considerados importantes para a nutrição. Grande parte destes nutrientes encontra-se ligados aos sólidos do leite, que quando transformados em queijos ou outros produtos mantêm seu valor nutricional conservado (Mwaura & Akinsoyinu, 2010).

## **Vitaminas**

As vitaminas exercem função importante na produção de energia, síntese da hemoglobina, manutenção da estrutura óssea, função imune adequada e protegem o organismo contra danos oxidativos (Guerra, 2004).

Os teores de vitaminas em leite de ovelha são na sua maioria mais elevados do que em vaca e leite de cabra, exceto para vitamina D e biotina (B7). Possui alto teor de vitaminas essenciais: tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantotênico (B5), ácido fólico (B9), vitaminas A, B12 e C. O leite ovino contém entre 33% a 50% mais vitaminas do complexo B que o leite de cabra, sendo que a maior diferença nutricional entre

os dois leites é o nível de vitamina B12. O leite de ovelha contém 0,712 µg de vitamina B12 por 100 g, em comparação com 0,065 µg no leite de cabra (Park et al., 2007).

### 2.3 Produção do leite ovino no Brasil e no mundo

Atualmente, o rebanho ovino mundial apresenta mais de um bilhão de animais, sendo que a cadeia produtiva do leite de ovelha ultrapassou 10,122 milhões de toneladas, o que corresponde cerca 1,34% da produção mundial, compreendendo um pequeno percentual do mercado total de leite. A Ásia lidera a produção com 4,7 milhões de toneladas de leite de ovelha na China, Turquia, Irã, Síria, Afeganistão e Iraque. A Europa apresenta a segunda maior produção mundial de leite de ovelha, com 3,0 milhões de toneladas, principalmente na Grécia, Romênia, Itália, Espanha e França (FAOSTAT, 2012).

A aptidão leiteira ovina e caprina é tradicionalmente explorada e considerada parte vital da economia nacional, em muitos países, em especial no Mediterrâneo e região do Oriente Médio, para o processamento de produtos nas próprias propriedades rurais ou em pequenos estabelecimentos artesanais (Boyazoglu & Morand-Fehr, 2001; Rohenkohl et al., 2011). A produção leiteira, industrialmente organizada, concentra-se na França, Itália, Espanha e Grécia (Haenlein & Wendorff, 2006) e está crescendo na Austrália e em Israel, tendo em vista a produção de queijos e de outros produtos lácteos, sendo insignificante o consumo do leite *in natura* (Mayer & Fiechter, 2012).

A produção e o processamento industrial de leite de ovelha ainda são considerados baixos no Brasil, e Rohenkohl et al. (2011) ao compilarem dados sobre esta atividade no país, estimaram processamento nacional de leite ovino de aproximadamente 509.000 litros por ano. O panorama nacional da ovinocultura demonstra que o efetivo de ovinos em 2012 foi de 16,789 milhões de cabeças, sendo que a região Nordeste apresentou o maior rebanho (55,5%) representado por mais de nove milhões de cabeças, seguido da região Sul, com cinco milhões de cabeças (30,0%), destacando-se o Rio Grande do Sul com um rebanho composto por quatro milhões de animais, representando 24,4% do efetivo nacional. A região Centro-Oeste apresentou o terceiro maior rebanho com 1.078.316 milhões de cabeças, seguida da região Sudeste, com 768.210 cabeças e da região Norte com 627.563 cabeças (IBGE, 2012).

Apesar de ser pouca explorada no Brasil, a habilidade leiteira das ovelhas é largamente conhecida. Em outras partes do mundo, esses animais são os principais produtores de leite, devido a longa tradição na criação de ovinos aliada às condições topográficas e climáticas favoráveis a criação desta espécie (Haenlein & Wendorff, 2006; Pandya & Ghodke; 2007).

Os primeiros ovinos com aptidão leiteira foram trazidos ao Brasil somente em 1992, com a introdução da raça especializada Lacaune, originária da França, no município de Viamão, no estado do Rio Grande do Sul. A raça Lacaune, adaptou-se às condições de clima e alimentação do estado, e conforme demonstrado por Brito (2004) a duração média da lactação desta raça na Serra Gaúcha, foi de 160 dias, com produção média de 1,3 litros/ovelha/dia. Essa baixa produção é compensada pelo excelente rendimento no beneficiamento do leite, pois com base no rendimento econômico, Gajo (2010) observou um elevado aproveitamento na elaboração de queijo Minas Padrão, utilizando leite ovino, em que para cada quilo de queijo produzido com leite de ovelhas Santa Inês (SI), Bergamácia e mestiças (SI x Lacaune), foram necessários menores volumes (4,6; 4,4 e 4,3 litros de leite, respectivamente) comparado com a utilização de leite de outras espécies. Silveira & Abreu (2003) observaram rendimento variando de 8,4 a 9,5 litros para um quilo de queijo prato elaborado com leite de vaca, enquanto Katili et al. (2006) descreveram rendimento de queijo maturado de 7,6 a 8,14 g/100g produzido a partir de leite de cabra.

De acordo com a tendência mundial, a demanda pelo leite de ovelha no Brasil também está direcionada para a produção de queijos e produtos fermentados, e praticamente não existe o consumo de leite fluído. O crescente aumento da entrada de produtos lácteos de ovelha, cabra e búfala de outros países para atender o interesse de consumidores, vem consolidando em algumas regiões a criação de ovinos leiteiros (Haenlein & Wendorff, 2006).

Entretanto, em virtude dos elevados preços dos animais e das barreiras sanitárias, tornou-se necessário conhecer o potencial leiteiro de raças nativas do Brasil, como a Santa Inês, especializada em carne ou que apresenta dupla aptidão, mas com vantagem quanto à disponibilidade e adaptação à região (Ribeiro et al., 2007).

#### **2.4 Potencial tecnológico do leite ovino**

A produção de leite de ovelhas é a principal fonte de nutrientes para os cordeiros durante as primeiras semanas de vida (Godfrey et al., 1997) e também, é importante para o mercado de leite para a produção de queijos finos e outros derivados (Peeters et al., 1992; Pellegrini, 2012).

Para Pellegrini (2012) o leite de ovelha pode contribuir com o fornecimento considerável de macro e micro-elementos na dieta, e a partir do conhecimento da composição mineral, o leite de ovelha e seus derivados podem ser valorizados e representarem alternativa lucrativa para os produtores destes pequenos ruminantes. De maneira geral, o autor destacou

que o alto teor de sólidos totais, proteínas e gordura do leite ovino são ideais para a fabricação de derivados lácteos, e a alta demanda para produtos lácteos tradicionais e/ou artesanais criam excelentes oportunidades para pequenos e médios produtores que podem, desta forma aumentar a renda proveniente do processamento em pequena escala, beneficiando-se das características específicas do leite ovino para produzir queijos especiais, iogurtes e outros derivados lácteos.

A qualidade do leite ovino está relacionada à sua capacidade de ser transformado em produtos lácteos de alta qualidade e à produção com altos rendimentos por litro de leite, pois a maior parte do leite de ovelha produzido em todo mundo é transformada em queijo e, em menor proporção, em iogurte (Bencini & Pulina, 1997).

A coalhada formada a partir do leite de ovelha é muito mais firme que a obtida de leite de vaca (Luquet, 1985), em consequência das diferenças de composição em nível de riqueza em matéria coagulável, essencialmente proteína e matéria gorda, e também devido à composição e características da fração proteica, mais precisamente a fração caseínica, determinante na produção de queijo.

Novello & Preis (2012) ao pesquisarem o desenvolvimento e caracterização de queijo minas curado elaborado com leite de ovelha, comprovaram que a produção deste queijo mostrou ser viável, principalmente, devido ao bom rendimento obtido e devido às características físico-químicas e microbiológicas, além ser um produto com alto valor agregado.

## **2.5 Fatores que interferem na composição do leite ovino**

Muitos fatores que contribuem para as variações na produção e na qualidade do leite têm sido descritos na espécie ovina, tais como, o ambiente e época do ano (Park et al., 2007), o genótipo e idade da ovelha (Corrêa et al., 2006 e 2008), estágio da lactação (Souza et al., 2005; Brito et al., 2006, Blagitz et al., 2013), estado sanitário e infecções de úbere (Gomes et al., 2008; Onni et al., 2010; Guaraná et al., 2011), manejo do rebanho e nível nutricional durante a gestação e lactação (Hubner et al., 2007; Pradieé, 2008; Nudda et al., 2013) e partos gemelares (Pires et al., 2012).

Considerando aspectos ambientais e genéticos, estudos considerando período de lactação demonstram que matrizes cruzadas produzem mais leite que as raças maternas, e que o aumento da luminosidade, de forma artificial, durante o inverno aumenta a produção e os valores dos constituintes do leite (Corrêa et al., 2006; Morrissey et al., 2008; Ferreira et al., 2011).

## Raça

Gajo (2010) analisando a composição físico-química do leite de ovelhas das raças Santa Inês, Bergamácia e mestiças (SI x Lacaune), utilizado na elaboração do queijo tipo Minas Padrão, demonstrou que não houve diferença ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros de composição, conforme apresentado na Tabela 2 e que o rendimento do leite na fabricação de queijos apresentou média de 4,4 litros para cada kilo.

Tabela 2. Composição físico-química do leite de ovelhas das raças Santa Inês, Bergamácia e mestiças (Santa Inês x Lacaune).

Parâmetros determinados						
Raças	Gordura <sup>1</sup>	Proteína <sup>1</sup>	*EST <sup>1</sup>	Cinzas <sup>1</sup>	AT <sup>2</sup>	Densidade
Santa Inês	5,58±0,9a	7,74±0,9b	16,38±0,0c	0,75±0,3d	27±2,5f	1,037±0,02e
Bergamácia	5,56±0,3a	8,01±0,1b	15,64±0,0c	0,62±0,1d	28±2,1f	1,036±0,01e
Mestiça	6,14±1,3a	7,94±0,7b	16,96±0,0c	0,56±0,0d	24±1,6f	1,034±0,01e

\* EST: Extrato seco total

<sup>1</sup> Gramas/100ml; <sup>2</sup> AT: Acidez titulável (° Dornic)

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Fonte: Gajo (2010)

Kondyli et al. (2012) também não observaram diferenças para gordura, proteína, lactose, caseína e conteúdos sólidos não gordurosos de leite de ovelha das raças nativas Boutsiko e Karamaniko, ovelhas criadas no norte da Grécia Ocidental.

## Estágio de lactação

Souza et al. (2005) e Zimmermann et al. (2009) comprovaram que existe um efeito significativo do estágio lactação na produção de leite. A curva de lactação dos animais estudados obteve pico de produção na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas e decréscimo nas semanas subsequentes, caindo drasticamente a partir da 7<sup>a</sup> semana (45 dias) de lactação.

De acordo com Bencini & Pulina (1997) há uma correlação negativa entre a produção e a composição do leite, portanto, quando as ovelhas produzem mais leite, a concentração de gordura e proteína diminui. De acordo com Brito et al. (2006) o maior teor de lactose foi observado aos 30 dias de lactação, coincidindo com o pico de produção.

Blagitz et al. (2013) determinaram que a fase final da lactação de ovelhas da raça Santa Inês foi responsável por elevação nos teores de gordura e proteína e redução no teor de lactose, embora não tenha sido observada alteração no teor de extrato seco total no leite.

### **Época do ano**

Sá et al. (2005) avaliaram a influência do fotoperíodo na produção e composição do leite de ovelhas Bergamácia, e constataram que o maior número de horas de luz (18 horas) estimula a produção de leite no primeiro mês de lactação, e as porcentagens de gordura e sólidos totais são menores nos períodos de maior produção de leite, mesmo que o consumo alimentar não seja influenciado pela luminosidade.

Fava (2012) relatou que a lactose e a proteína variaram de acordo com as épocas do ano, observando-se aumento significativo da lactose durante o outono e queda da proteína neste mesmo período. Demonstrou ainda em seu estudo que a gordura não apresentou variação sazonal significativa, contrariando observações de outros autores que descreveram que este é o componente que sofre maiores variações (Assenat, 1991; Park et al., 2007).

### **Presença de infecções intramamárias**

A mastite é a denominação do processo inflamatório na glândula mamária, que pode ter várias origens: infecciosa, térmica, traumática ou fisiológica (Costa, 1998). Dentre estas, a infecciosa apresenta maior importância, sendo as bactérias as maiores indutoras deste processo inflamatório. A reação inflamatória é um mecanismo de defesa para eliminar o agente agressor, neutralizar suas toxinas e auxiliar no reparo dos tecidos produtores de leite (Philpot & Nickerson, 2002), interfere na qualidade e reduz a quantidade de leite secretada pelo animal (Zafalon et al., 2010b).

As alterações provocadas no tecido mamário refletem não somente na produção, como também nas características físico-químicas do leite, cujos principais componentes podem estar alterados, diminuindo a concentração de gorduras e proteínas (Santos & Fonseca, 2007), comprometendo a qualidade nutricional deste para a alimentação dos borregos (Moroni et al., 2007; Santos et al., 2007) e para a elaboração de produtos lácteos (Alexopoulos et al., 2011). O *California Mastitis Test* (CMT) é considerado um teste útil como triagem para identificação de mastite subclínica, sendo empregado como preditor de infecções mastíticas, apresentando correlação positiva com a contagem de células somáticas e o isolamento bacteriano (McDougall et al., 2001) embora a utilização deste teste nos rebanhos ovinos é limitado.

Entretanto, Guaraná et al. (2009) afirmaram que a mastite subclínica diagnosticada durante a lactação comprometeu de forma branda a qualidade físico-química do leite, provavelmente em decorrência da baixa patogenicidade do *Staphylococcus* coagulase positivo isolado em 79,2% das amostras de leite de ovelhas Santa Inês.



O gênero com maior frequência de isolamento encontrado por Almeida et al. (2009), Bolsanello et al. (2009), Dorneles (2010) e Tejada et al. (2012) também foi *Staphylococcus* (*S. coagulase* negativo e *S. aureus*). Para Almeida et al. (2009) os agentes bacterianos isolados dos casos de mastite subclínica, acarretaram em alterações nos valores da acidez Dornic, densidade, teor de cloretos e pH do leite, representando um sério problema de ordem econômica nesta espécie animal.

Além dos agentes bacterianos, segundo Dorneles (2010), as leveduras são consideradas saprotróficas, fazendo parte da microbiota residente, embora, em alguns casos, elas possam provocar infecções na glândula mamária. No experimento realizado pela autora, do total de amostras de leite ovino analisadas, 27,04% foram positivas no exame micológico e 68,36% positivas no exame bacteriológico. No cultivo micológico foram isolados principalmente micro-organismos do gênero *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp.

Deste modo, observa-se a importância da realização concomitante de exames micológicos e bacteriológicos para o correto diagnóstico e monitoramento dos casos de mastite em ovinos.

## **2.6 Características físicas do leite ovino**

### **Acidez**

A acidez é normalmente utilizada como indicador do estado de conservação do leite em função da relação entre disponibilidade de lactose e produção de ácido láctico por ação microbiana. A acidez média em graus Dornic (°D) está diretamente relacionada com a concentração do dióxido de carbono, proteína, fosfatos e citratos do leite. O teste de acidez é um dos mais comumente utilizados pela indústria leiteira e tem grande valor, uma vez que indica se o leite foi mantido em boas condições de controle do desenvolvimento dos micro-organismos mesofílicos (Fonseca & Santos, 2000).

De acordo com Guerra et al. (2008) esse parâmetro possui valores semelhantes em leite ovino, caprino e bovino, contudo Brito (2004) e Pellegrini et al. (2012) encontraram valores médios de acidez mais elevados em leite de ovelha.

### **pH**

Segundo Pellegrini et al. (2012) o leite ovino diferiu estatisticamente dos leites bovino e caprino em relação ao pH, apresentando valores superiores. Entretanto, Assenat (1991), Brito (2004), Souza et al. (2005) determinaram o valor médio do pH de leite fresco de

ovelha, respectivamente 6,65; 6,53 e 6,7, semelhante ao do leite de vaca. Ainda, para Gutiérrez (1991), a maior quantidade de caseína, fosfatos e demais componentes ácidos da matéria seca deste tipo de leite faz com que o pH oscile entre 6,3 e 6,6, um pouco mais ácido que os leites de cabra e vaca.

### **Densidade**

A densidade do leite é obtida relacionando seu peso e volume. A densidade do leite de vaca varia entre 1,028 a 1,034 g/mL, a de leite de cabra entre 1,026 a 1,042 g/mL e a densidade média determinada em leite de ovelha foi de 1,036 g/mL (Souza et al., 2005), com variação entre 1,034 a 1,038 g/mL (Park et al., 2007).

Considerada maior que dos demais leites (Brito, 2004; Souza et al., 2005; Pellegrini et al., 2012), com tendência de aumento até a metade da lactação e que depois diminua no final, quando a quantidade de gordura aumenta (Assenat, 1991).

### **Índice Crioscópico**

O índice crioscópico ou ponto de congelamento é definido como a temperatura de congelamento do leite, usualmente utilizado para detectar fraudes causadas por adição de água, sendo um dos parâmetros analíticos de precisão empregados para determinar a qualidade físico-química do leite. Embora a crioscopia seja uma das características mais estáveis do leite, pode apresentar variação (Santos & Arcari, 2012). Este parâmetro está diretamente ligado ao extrato seco total (EST) do leite, mais precisamente relacionado aos teores de lactose e cloretos (Tronco, 2003).

O índice crioscópico do leite ovino apresenta-se com valores menores que o leite de vaca (Park et al., 2007), com médias de -0,570 °C e -0,530 °H, respectivamente. Esta diferença se deve à elevada quantidade de sólidos que o leite ovino contém, fazendo aumentar o EST, diminuindo o índice crioscópico (Tronco, 2003; Pellegrini et al., 2012).

## **2.7 Microbiota do leite**

Pesquisas demonstram que a microbiota presente no queijo será tendencialmente a presente no leite que lhe deu origem ao lado das culturas *starters* adicionadas, as quais serão responsáveis pelas características sensoriais que o caracterizam. Por outro lado, a carga microbiana do leite cru também pode ser potencialmente patogênica para o consumidor, sendo de extrema importância na qualidade final dos produtos lácteos,

especialmente na fabricação de queijos artesanais (Barreira, 2008; Alexopoulos et al., 2011).

Sabe-se que a microbiota do leite é constituída por micro-organismos desejáveis para o desenvolvimento do queijo e por aqueles que eventualmente, podem ser patogênicos para o consumidor, incorporados por contaminações cruzadas após a ordenha ou mesmo antes, na presença de mastite, sendo a composição específica desta microbiota sempre uma incógnita (Barreira, 2008).

E, portanto, há anos, alguns micro-organismos são utilizados como indicadores da qualidade higiênica do processo de produção de alimentos, sendo os principais grupos os aeróbios mesófilos e os coliformes (Franco & Landgraf, 2005).

### **Micro-organismos aeróbios mesófilos**

Micro-organismos aeróbios mesófilos (AM) são todos aqueles capazes de desenvolverem em temperaturas de 35 a 37°C em condições de aerobiose. Esses micro-organismos indicam a qualidade com que o alimento foi obtido ou processado, e sua presença em altas contagens é indicativa de procedimentos higiênicos inadequados na produção, no beneficiamento ou na conservação, dependendo da origem da amostra (Franco & Landgraf, 2005).

Considera-se também que todos os micro-organismos potencialmente patogênicos de origem alimentar em humanos são mesófilos. Embora com limitações, a contagem dos micro-organismos AM tem uma especial importância na microbiologia alimentar, podendo ser utilizada para aferir a qualidade higiênica, determinar a aceitabilidade organoléptica, verificar a aplicação de boas práticas de fabricação e ainda, como indicador de segurança alimentar (Ponciano, 2010).

### **Coliformes totais e coliformes termotolerantes**

Coliformes totais é um grupo composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37°C, por 24-48 horas. São bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e não formadores de esporos (Franco, 2003).

Os gêneros pertencentes a esse grupo de micro-organismos incluem: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia coli*. Essas bactérias podem ser encontradas nas fezes e outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal. Consequentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou

ocorrência de enteropatógenos, sendo importantes indicadores de condições higiênicas insatisfatórias, com provável contaminação pós-processamento, deficiência nos processos de limpeza, sanitização e tratamento térmico, ou multiplicação durante o processamento ou estocagem (Franco & Landgraf, 2005).

Entre os coliformes, existe um grupo que apresenta a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas a temperaturas de 44-45°C em 24 horas (Franco, 2003), são denominados coliformes termotolerantes. O principal componente deste grupo é *Escherichia coli*, considerado como um micro-organismo comensal dos intestinos dos animais e humanos, mas a sua recuperação nos alimentos pode ser uma preocupação de saúde pública devido à possível presença de estirpes enteropatogênicas e/ou tóxicas. Sua pesquisa é de extrema importância para a saúde pública, pois além de ser considerado o contaminante mais comum do leite cru e processado, possui cepas enteropatogênicas, que podem causar diarreia e vômito em crianças e cepas toxigênicas, como a *E. coli* O157:H7, que podem causar síndrome urêmica hemolítica (Jay, 2005; Mhone et al., 2011).

### **Bolores e leveduras**

O leite é considerado um bom substrato para o desenvolvimento de diversos micro-organismos, dentre os quais, uma variada gama de leveduras com distintas características biológicas. Em geral, as leveduras são consideradas saprotróficas, fazendo parte da microbiota residente, entretanto, em alguns casos, elas podem provocar infecções na glândula mamária (Dorneles, 2010).

Os bolores, quando em altas contagens, podem representar perigo à saúde devido à produção de micotoxinas, e ainda provocarem a deterioração dos alimentos, tornando-os impróprios para o consumo, causando significativo prejuízo econômico (Franco & Landgraf, 2005).

### ***Staphylococcus aureus***

*S. aureus* é uma bactéria que se apresenta em forma de cocos Gram-positivos, são coagulase positivos, maltose e manitol positivos (Jay, 1994). Destaca-se como um dos micro-organismos mais importantes que podem ser transmitidos através dos alimentos causando doenças em humanos (Perillo et al., 2012). Existem vários relatos de ocorrências de gastroenterite, pelo consumo de leite cru contaminado, bem como, pela ingestão de enterotoxinas termoestáveis contidos em leites ou derivados lácteos tratados termicamente (Zecconi & Hahn, 2000; Cunha & Cunha, 2007; Borges et al., 2008).

É o patógeno predominante em casos de mastite em ruminantes leiteiros, responsável pela manifestação clínica e subclínica e isso o torna um contaminante comum do leite cru (Mhone et al., 2011; Bonnefont et al., 2012).

### ***Listeria monocytogenes***

*Listeria* spp. é um cocobacilo Gram-positivo, não esporulado, não produtor de ácidos, anaeróbio facultativo, com características psicrotróficas, amplamente distribuído no ambiente. Tem sido isolado de águas superficiais, de esgotos domésticos, águas residuárias de indústrias de laticínios e de abatedouros, de solos, de insetos, de adubo orgânico e em fezes de animais e de humanos, podendo ser isolada em diversos produtos alimentícios sejam crus ou após tratamentos térmicos ou químicos (Ryser & Marth, 1991; Koneman, et al., 1997; Franco & Landgraf, 2005).

Nos últimos anos, a presença de *Listeria* spp. vem sendo estudada na microbiologia de alimentos, pois dentre as seis espécies do gênero *Listeria*, a única patogênica transmitida por alimentos é *Listeria monocytogenes*. Com dose infectante desconhecida, é causador de doença severa com altas taxas de mortalidade em indivíduos pertencentes aos grupos de risco como gestantes, recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos (Catão & Ceballos, 2001, Hofer et al., 2006; Montville & Matthews, 2008).

Apesar de muitos alimentos poderem veicular *L. monocytogenes*, a listeriose está principalmente associada à ingestão de alimentos como os frutos do mar, produtos lácteos, com destaque para o leite cru, queijos e produtos a base de carne vermelha e aves, contaminados (Montville & Matthews, 2008).

Pesquisas de Duarte et al. (2005) revelaram a presença de *Listeria* spp. em 9,5% e *L. monocytogenes* em 5,5% de amostras de queijo coalho no estado de Pernambuco. Em contraste, Catão & Ceballos (2001) observaram maior número de amostras de leite cru positivas para *Listeria* spp. (73,3%) e *L. monocytogenes* (51,5%) no estado da Paraíba, com a identificação de grande diversidade de espécies de *Listeria*, com predominância de *L. monocytogenes*, seguida por *L. innocua*, e em menores porcentagens, *L. ivanovii* e *L. grayi*.

### ***Salmonella* spp.**

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos, Gram negativos, não esporulados, anaeróbicos facultativos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. As espécies desse gênero são mesófilas com desenvolvimento entre 30 a 40°C, mas alguns sorotipos são psicrotróficos,

com desenvolvimento entre 5 a 30°C. Crescem em ampla faixa de pH (4,5 a 8,0), com ótimo entre 6,0 a 7,5 (D'Aoust et al., 2001; Bopp et al., 2003).

*Salmonella* tem sido relatada como o agente etiológico mais frequente em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), associadas principalmente por veiculação por leite e produtos lácteos. No Brasil, relatos da ocorrência de *Salmonella* spp. em queijo coalho foram registrados por Feitosa et al. (2003), Duarte et al. (2005), Santana et al. (2008) e Machado et al. (2011). A contaminação dos queijos por esse patógeno tem sido atribuída, principalmente, ao leite usado na fabricação (cru ou pasteurizado inadequadamente) ou à contaminação pós-pasteurização (Borges et al., 2010).

### **Bactérias ácido lácticas**

Bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo de micro-organismos Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que geralmente desenvolvem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas (Kondyli et al., 2012). Os mais importantes gêneros de BAL são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium*. São classificados em homofermentativas e heterofermentativas, sendo característica dos primeiros a produção de ácido lático enquanto que as heterofermentativas produzem, além de ácido lático, substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (Klein et al., 1998; Holzapfel et al., 2001; Bruno & Carvalho, 2009).

Representantes das primeiras incluem *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns lactobacilos, enquanto as últimas apresentam como membros importantes *Leuconostoc*, *Weissella* e também alguns lactobacilos (Jay et al., 2005).

BAL são amplamente utilizadas na tecnologia de fabricação de diversos produtos lácteos como iogurtes, cremes, queijos frescos e maturados, por exemplo, pois, o seu metabolismo gera a produção de diversas substâncias que conferem sabores, odores e texturas específicas. Pesquisas comprovam o potencial probiótico de diversas BAL e alimentos que propõem melhorias à saúde do consumidor, principalmente contendo micro-organismos ditos probióticos, são amplamente comercializados. Os probióticos são alimentos suplementados com micro-organismos vivos (*Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium*) e que, consumidos regularmente em quantidades suficientes, devem produzir efeitos benéficos à saúde e ao bem estar; além dos efeitos nutricionais habituais que beneficiam o hospedeiro por meio da melhoria no equilíbrio da microbiota intestinal (Varavallo et al., 2008; Costa et al., 2013).

São também, conhecidas pela produção de várias substâncias antimicrobianas, potencialmente utilizadas na bioconservação de alimentos (Delavenne et al., 2012). Ortolani et al. (2010) detectaram BAL naturalmente presentes em amostras de leite de vaca e queijo minas frescal produzidos no estado de MG, com atividade antagonista em relação a *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Lactobacillus sakei*, mas não contra *Salmonella* spp.. Costa et al. (2013) confirmaram atividade inibitória de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo artesanal em relação as amostras patogênicas *Salmonella* spp. e *E. coli*.

Com a exigência dos consumidores por produtos minimamente processados, com menos conservantes químicos, pesquisas buscam caracterizar BAL que possuam atividade antimicrobiana e potencial de uso como bioconservador. Assim, uma vez caracterizado o potencial de inibição de BAL, estas poderão ser aproveitadas de forma adequada pela indústria de alimentos, podendo representar uma excelente alternativa para usar em combinação com outros conservantes naturais e serem exploradas comercialmente na preservação e extensão da vida útil dos alimentos a fim de garantir segurança alimentar em leite e derivados e diversos outros produtos (Guedes Neto et al., 2005; Deegan et al., 2006; Ortolani, 2009; Ortolani et al., 2010; Delavenne et al., 2012; Costa et al., 2013).

Para Widyastut et al. (2014) BAL podem ser amplamente utilizadas no desenvolvimento de novos produtos lácteos fermentados, considerando os relatórios existentes sobre várias propriedades de promoção da saúde, como produção de bacteriocinas que possuem o *status* de segurança GRAS (reconhecido como seguro) para o consumo humano, não ocasionando enfermidades aos consumidores (Castellano et al., 2008).

## 2.8 Qualidade do leite ovino

A qualidade de produtos lácteos prontos é inteiramente dependente da qualidade microbiológica do leite cru e saneamento adequado nos processos de fabricação, principalmente quando o produto é um queijo de leite cru (Hayes & Boor, 2001).

Diversos estudos têm sido realizados objetivando a avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de leites de diversas espécies, em especial a bovina (Ribas et al., 2004; Gonzalez et al., 2004; Bueno et al., 2005; Arcuri et al., 2006; Martins et al., 2008; Alves et al., 2009; Andrade et al., 2009 e Vallin et al., 2009). As características da microbiota e composição do leite de búfalas e cabras também têm despertado o interesse dos pesquisadores (Kapronezai et al., 2005; Coelho et al., 2004; Figueiredo et al., 2010; Vittori et

al., 2008; Ceballos et al., 2009; Goetsch et al., 2011; Gürler et al., 2013; Yamazi et al., 2013), no entanto pesquisas com leite de ovelha no Brasil ainda são escassas.

Na Grécia, Kondyli et al. (2012) relataram que a qualidade microbiológica do leite cru de ovelhas, foi em geral, melhor do que o do leite de cabras, com base na contagem bacteriana total e contagens de enterobactérias e psicrotóxicos presentes nas amostras, essas diferenças poderiam estar relacionadas à fatores como estágio de lactação, condições higiênicas de produção de leite, manejo e procedimentos de coleta.

Com relação à microbiota láctica, Medina et al. (2011) ao isolarem BAL do leite cru de ovelhas na Argentina, verificaram a predominância de espécies do gênero *Enterococcus* (48%), seguido por *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* (30%), *Lactococcus* spp. (14%) e *Leuconostoc* spp. (8%), podendo ser provenientes de várias fontes, como diretamente do leite. Acurcio (2011) em Minas Gerais (MG), também observou a presença do gênero *Enterococcus* no leite de ovelhas das raças Lacaune, Santa Inês e mestiças, com predomínio de *E. faecium*, *E. durans* e *E. casseliflavus* não sendo identificado desenvolvimento dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* ou *Streptococcus*. Meira et al. (2012) em pesquisa realizada no Sul do Brasil, descreveram ação antagonista de BAL isoladas de leite e queijo de ovelha, contra agentes patogênicos *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. associando a produção de ácidos orgânicos a este efeito.

No Brasil, os estudos sobre este leite são principalmente referentes à ocorrência de infecções intramamárias (Bergonier & Berthelot, 2003; Coutinho et al., 2006; Bolsanello et al., 2009; Peixoto et al., 2010; Zafalon et al., 2010a; Guaraná et al. 2011) e trabalhos que avaliam sua produção e composição (Corrêa et al., 2006; Zeppenfeld et al., 2007; Pradieé et al., 2012; Mayer & Fiechter, 2012; Pellegrini, 2012). Na literatura consultada não foram encontrados dados relativos a este tema, de rebanhos ovinos criados na região Centro-Oeste.



### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, L.C. Composição do Leite de Ovelha. 2012. **Ciência do Leite**. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/?action=1&a=351&type=0>>. Acesso em 29 abr. 2013.

ALEXOPOULOS, A.; TZATZIMAKIS, G.; BEZIRTZOGLU, E.; PLESSAS, S.; STAVROPOULOU, E.; SINAPIS, E.; ABAS, Z. Microbiological quality and related factors of sheep milk produced in farms of NE Greece. **Journal of the Anaerobe Society of the Americas**, n. 17, p. 276-279, 2011.

ALMEIDA, M.Z.P.R.B.; OLIVEIRA, L.G.L.; AFONSO, J.A.B.; LÁZARO, N.S.; MENDONÇA, C.L. Influência da infecção intramamária sobre as características físico-químicas do leite de ovelhas da raça Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**. In: Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. Suplemento 1, p. 760-765, 2009.

ALVES, L.M.C.; AMARAL, L.A.; CORRÊA, M.R.; SALES, S.S. Qualidade microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís - MA. **Pesquisa em Foco**, v. 17, n. 2, p. 01-13, 2009.

ACURCIO, L.B. **Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido-láticas isoladas de leite de ovelha**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

ANDRADE, U.V.C.; HARTMANN, W.; MASSON, M.L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, v. 25, n. 3, 129-135, 2009.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

ASSENAT, L. **Composición e propiedades**. In: LUQUET, F.M. Leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra. Zaragoza: Acribia, 1991. p.277-313.

BARREIRA, A.C.R. **Avaliação da qualidade do leite de ovelha na Beixa Baixa com base em contagem de células somáticas**. 2008. 121f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa.

BENCINI, R. Factors affecting the quality of ewe's milk. In: **Great Lakes dairy sheep symposium**, 7, 2001. Proc... Eau Claire (Wisconsin): Wisconsin Sheep Breeders Cooperative. 2001. Disponível em: [http://www.uwex.edu/ces/animalscience/sheep /Publications\\_and\\_Proceedings/res.html](http://www.uwex.edu/ces/animalscience/sheep/Publications_and_Proceedings/res.html)>. Acesso em: 27 mai. 2011.

BENCINI, R.; PULINA, G. The quality of sheep milk: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 37, n. 5. 1997.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. **Livestock Production Science**, v. 79, p. 1-16, 2003.

BLAGITZ, M.G.; BATISTA, C.F.; GOMES, V.; SOUZA, F.N.; LIBERA, A.M.M.P.D. Características físico-químicas e celularidade do leite de ovelhas Santa Inês em diferentes estágios de lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p.454-461, 2013.

BONNEFONT, C.M.; RAINARD, P.; CUNHA, P.; GILBERT, F.B.; TOUFEER, M.; AUREL, M.R.; RUPP, R.; FOUCRAS, G. Genetic susceptibility to *S. aureus* mastitis in sheep: differential expression of mammary epithelial cells in response to live bacteria or supernatant. **Physiol Genomics**. v. 44, n. 7, p. 403-416, 2012.

BOLSANELLO, R.X.; HARTMAN, M.; DOMINGUES, P.F.; MELLO JÚNIOR, A.S.; LANGONI, H. Etiologia da mastite em ovelhas Bergamácia submetidas à ordenha mecânica, criadas em propriedades de Botucatu, SP. **Veterinária e Zootecnia**. v. 16, n. 1, p. 221-227, 2009.

BOPP, A.C.; BRENNER, F.W.; FIELDS, P.I.; WELLS, J.G.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. Washington D. C.: ASM, v. 1, cap. 42, p. 654-671, 2003.

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y. Staphylococcus enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: Revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba v. 26, n. 1, p.71-86, jan-jun. 2008.

BORGES, M.F.; ANDRADE, A.P.C.; MACHADO, T.F. Salmonelose associada ao consumo de leite e produtos lácteos. Fortaleza, Documentos: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2010. 26 p. ISSN 2179-8184.

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

BRITO, M.A. **Variação dos perfis metabólico, hematológico e lácteo em ovinos leiteiros na Serra Gaúcha**. 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004.

BRITO, M.A.; GONZÁLEZ, F.D.; RIBEIRO, L. A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P.R.; BERGMANN, G. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 942-948, 2006.

BRUNO, L.M.; CARVALHO, J.D.G. Microbiota Láctica de Queijos Artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, 2009.

BUENO, V.F.F.; ALBENONES, J.M., NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; THOMAZ, L.W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, jul-ago. 2005.

CAMPOS, L. Aspectos benéficos do leite de ovelha e seus derivados. 2011. **Casa da ovelha**. Disponível em: <[http://www.casadaovelha.com.br/files/pesquisa\\_tecno\\_cientifica.pdf](http://www.casadaovelha.com.br/files/pesquisa_tecno_cientifica.pdf)> Acesso em: 17 abr. 2013.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v. 79, p. 483-499, 2008.

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CEBALLOS, L.S.; MORALES, E.R.; ADARVE, G.L.T.; CASTRO, J.D.; MARTÍNEZ, L.P.; SAMPELAYO, M.R.S. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.22, p.322-329, 2009.

CELIA, A.P.; MORAES, J.F.D.; SCHMIDT, V. Consumo de produtos lácteos de origem não bovina no Sul do Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 67, n. 357, p. 25-30, 2012.

COELHO, K.O.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A.; GASSOLI, L.D.; CORASSINI, C.H. Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas, por meio de analisadores automáticos. **Ciência Animal Brasileira**. v. 5, n. 3, p. 167-170, 2004.

CORDERO, M.A.O.; TORRES-HERNÁNDEZ, G.; OCHOA-ALFARO, A.E.; VEJAROQUE, L.; MANDEVILLE, P. B. Milk yield and composition of Rambouillet ewe under intensive management. **Small Ruminant Research**, v. 43, n. 3, p. 269-274, 2002.

CORRÊA, G. F. **Produção e composição química do leite ovino em diferentes genótipos**. 2004. 143 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

CORRÊA, G.F.; OSÓRIO, M.T.M.; KREMER, R.; OSÓRIO, J.C.S.; PERDIGÓN, F.; SOSA, L. Produção e composição química do leite em diferentes genótipos ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 936-941, 2006.

CORRÊA, G.F.; OSÓRIO, M.T.M.; KREMER, R.; OSÓRIO, J.C.S.; PERDIGÓN, F.; SOSA, L.; LOPES, P.R.S.; RECH, C.L.S. Produção e composição química do leite de ovelhas Corriedale e cruzas Milchschaft. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 14, n. 2, p. 349-358. 2008.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CMRV-SP**. São Paulo, v. 1, p. 3-9, 1998.

COSTA, M.R.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; GIGANTE, M.L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara. v. 20, n. 3, p. 507-514, 2009.

COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACÚRCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.F.S.; NUNES, A.C. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.65, n.6, p.1858-1866, 2013

COUTINHO, D.A.; COSTA, J.N.; RIBEIRO, M.G.; TORRES, J.A. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. Bahia. v. 7, n. 2, p. 139-151, 2006.

CUNHA, A.S.; CUNHA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde & Ambiente em Revista**. v. 2, n. 1, p. 105-114. 2007.

CUNNINGHAM, J.G. A glândula mamária. In: STABENFELDT, G.H.; DAVIDSON, A.P. **Fisiologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 417-431.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.) **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2. ed. Washington: ASM, 2001. Cap. 18, p. 383-409.

DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; COLIN, H.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**. v. 16, p.1058 - 1071, 2006.

DELAVENNE, E.; MOUNIER, J.; DÉNIEL, F.; BARBIER, G.; LE BLAY, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. **International Journal of Food Microbiology**. v.155, p.185-190, 2012.

DORNELES, A.S. **Fungos e bactérias em leite de ovelhas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, 2010.

DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SILVA, J.V.D.; DA MOTA, R.A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.297-302, jul-set. 2005.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. 2012. <Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QA/E>>.

FAVA, L.W. **Caracterização físico-química do leite de ovelhas raça Lacaune e análise do rendimento de coalhada com caracterização física do soro obtido**. 2012. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 23, p.162-165, 2003.

FERREIRA, M.I.C. Produção de leite de ovelhas. Artigos técnicos. 2007. Disponível em: <<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=1580>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

FERREIRA, M.I.C.; BORGES, I.; MACEDO JUNIOR, G.L.; RODRIGUEZ, N.M.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R.; GOMES, M.G.T.; SOUZA, F.A.; CAVALCANTI, L.F. Produção e composição do leite de ovelhas Santa Inês e mestiças Lacaune e Santa Inês e desenvolvimento de seus cordeiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.530-533, 2011.

FIGUEIREDO, E.L.; LOURENÇO JUNIOR, J.B; TORO, M.J.U. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala “in natura” produzido no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n.1. p.19-28, 2010.

FONSECA, L.F.L. & SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. Lemos Editora, 2000. 175p.

FRANCO, B.D.G.M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo: Editora Atheneu, 2005.182 p.

FURTADO, M.M. **Queijos finos maturados por fungos**. São Paulo: Milkbizz, 2003. 128p.

GAJO, A.A. **Caracterização do leite de ovelhas Santa Inês, Bergamácia e mestiças durante o período de lactação e avaliação tecnológica na elaboração de queijo similar ao Minas Padrão**. 2010. 108f. Dissertação (Mestrado dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras. 2010.

GODFREY, R.W.; GRAY, M.L.; COLLINS, J.R. Lamb growth and milk production of hair and wool sheep in a semi-arid tropical environment. **Small Ruminant Research**. v. 24: p. 77-83. 1997.

GOETSCH, A.L.; ZENG, S.S.;GIPSON, T.A. Factors affecting goat milk production and quality. **Small Ruminant Research**. v.111, p.55-63, 2011.

GOMES,V.; BLAGITZ, M.G.; MADUREIRA, K.M.; LIBERA, A.M.M.P.D. Avaliação dos métodos de contagem de células somáticas (CCS) para diagnóstico de infecção mamária em ovelhas da raça Lacaune. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. v. 12, n. 2, 163-170, 2008

GONZALEZ, H.L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; GOMES, J.F.; STUMPF JR., W.; SILVA, M.A. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1531-1543, 2004.

GUARANÁ, E.L.S.; SANTOS, R.A.; SILVA, N.S.; CAMPOS, A.G.S.S.; AFONSO, J.A.B.; MENDONÇA, C.L. Influência da mastite subclínica sobre as características físico-química do leite de ovelhas Santa Inês em diferentes fases da lactação: Estudo preliminar. **Ciência Animal Brasileira**. In: Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. Suplemento 1, p. 754-759. 2009.

GUARANÁ, E.L.S.; SANTOS, R.A.; CAMPOS, A.G.S.S.; SILVA, N.S.; AFONSO, J.A.B.;

MENDONÇA, C.L. Dinâmica celular e microbiológica do leite de ovelhas Santa Inês acompanhadas durante a lactação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n.10, p. 851-858, 2011.

GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 245-250, 2005.

GUERRA, I. Importância da alimentação e da hidratação do atleta. **Revista Mineira de Educação Física**. v. 12, n. 2, p. 159-173, 2004.

GUERRA, I.C.D.; OLIVEIRA, C.E.V.; MAIA, J.M.; LIMA, F.A.; QUEIROGA, R.C. R.E.; OLIVEIRA, M.E.G.; BARBOSA, J.G.; FERNANDES, M.F.; SOUZA, E.D.; FILHO, E.C.P.; NETO, S.G. Análise comparativa da composição centesimal de leite bovino, caprino e ovino. In: Encontro de iniciação à docência, 10, 2008, UFPB, João Pessoa. Anais eletrônicos... Disponível em: <<http://www.prac.ufpb.br/anais/IXEnex/iniciacao/documentos/anais/6.SAUDE/6CCSDNMT10.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2011.

GÜRLER, Z.; KUYUCUOĞLU, Y.; PAMUK, S. Chemical and microbiological quality of Anatolian Buffalo milk. **African Journal of Microbiology Research**. v.7, n. 16, p. 1512-1517, 2013.

GUTIÉRREZ, R.B. **Elaboración artesanal de quesos de oveja**. Montevideo-Uruguay: Comunidad del Sur, 1991. 174p.

HAENLEIN, G.F.W.; WENDORFF, W.L. Sheep milk. Chapter 3. In: **Handbook of Milks of Non-bovine Mammals**. PARK, Y.W; HAENLEIN, G.F.W. ed. Blackwell Publishing, p. 137-194. 2006.

HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. (Eds.). **Applied dairy microbiology**, 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.59-76.

HOFER, E.; DOS REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v. 39, n. 1, p. 32-37, jan/fev. 2006.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.365S-373S, 2001.

HUBNER, C.H.; PIRES, C.C.; GALVANI, D.B.; CARVALHO, S.; WOMMER, T.P. Consumo de nutrientes, produção e composição do leite de ovelhas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de fibra em detergente neutro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 6, p.1882-1888, 2007.

HURLEY, W.L. **Topic areas in lactation biology**. 2002. Disponível em: <<http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/topicareas.html>>. Acesso em: 27 mai. 2011.

IBGE, **Produção da Pecuária Municipal, 2012**. Rio de Janeiro, v. 40, p.1-71, 2012.

IVANOVA, T.; PACINOVSKI, N.; RAICHEVA1, E.; ABADJIEVA, D. Mineral content of milk from dairy sheep breeds. **Macedonian Journal of Animal Science**, v. 1, n. 1, p. 67–71, 2011.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zagarosa: Acribia, 804 p. 1994.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 711p. 2005.

KAPRONEZAI, J.; MELVILLE, P.; BENITES, N.R. análise microbiológica, teste de Tamis e *California Mastitis Test* realizados em amostras de leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 183-187, abr./jun. 2005.

KATILI, L.M.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Aspectos físico-químicos e microbianos do queijo maturado por mofo obtido da coagulação mista com leite de cabra congelado e coalhada congelada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n.4, 2006.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of robiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 103- 125, 1998.

KONDYLI, E.; SVARNAS, C.; SAMELIS, J.; KATSIARI, M.C. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. **Small Ruminant Research**. v. 103, p. 194-199, 2012.

KONEMAN, E. K; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; Jr.WINN, W. C. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5. ed. Lippincott. NY, 1395p, 1997.

LUQUET, F.M. **O leite. Do úbere à fábrica de laticínios**. 1ºVolume. Título original: Laites et produits laitiers. Vache, brebis, chèvre. Vol.I De la mamelle a la laiterie. APRIA, Technique et Documentation Lavoisier, Paris. Publicações Europa-América. 1985.

MACHADO, T.F.; BORGES, M.F.; OLIVEIRA, F.E.M.; SOUSA, C.T. Isolamento e identificação em queijo coalho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza. 16 p. 2011.

MAHAUT, M.; SCHUCK, P.; BRULE, G.; JEANTET, R. **Les produits industriels laitiers**. Paris: Edition Tec e Doc, 2000. 22p.

MARTINS, M.E.P.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; ARRUDA, M.T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, out-dez. 2008.

MAYER, H.K., FIECHTER, G. Physical and chemical characteristics of sheep and goat milk in Austria, **International Dairy Journal**. v. 24, p. 57-63, 2012.

McDOUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 40, p. 245-254, 2001.

MEDINA, R.B.; OLISZEWSKI, R.; ABEIJÓN MUKDSI, M.C.; VAN NIEUWENHOVE, C.P.; GONZÁLEZ, S.N. Sheep and goat's dairy products from South America: Microbiota and its metabolic activity. **Small Ruminant Research**. v. 101, p. 84-91, 2011.

MEIRA, S.M.M.; HELFER, V.E.; VELHO, R.V.; LOPOES, F.C.; BRANDELLI, A. Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. **Journal of Dairy Research**. v. 79, p.119-127. 2012.

MHONE, T.A.; MATOPE, G.; SAIDI, P.T. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected small holder dairy farms of Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**. v.151, p.223-228, 2011.

MONTVILLE, T.J.; MATTHEWS, K.R. **Food Microbiology: An Introduction**. 2nd. Ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2008, 428p.

MORGANO, M.A.; SOUZA, L.A.; NETO, J.M.; RONDÓ, P.H.C. Composição mineral do leite materno de bancos de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 4, p. 819-824, 2005.

MORONI, P.; PISONI, G.; VARISCO, G.; BOETTCHER, P. Effect of intramammary infection in Bergamasca meat sheep on milk parameters and lamb growth. **Journal of Dairy Research**, n. 74, p. 340–344, 2007.

MORRISSEY, A.D.; CAMERON, A.W.; TILBROOK, A.J. Artificial lighting during winter increases milk yield in dairy ewes. **Journal Dairy Science**, v.91, p.4238-4243, 2008.

MWAURA, S.M.; AKINSOYINU, A.O. Calcium and phosphorus in milk of Yankansa ewes as influenced by stages of lactation. **Journal of Applied Biosciences**, Nigéria, v.26, p.1623-1630, 2010.

NOVELLO, Z.; PREIS, C. Desenvolvimento e caracterização de queijo minas curado elaborado com leite de ovelha. 2012. Disponível em: < <http://m.farmpoint.com.br/cadeia-produtiva/dicas-de-sucesso/desenvolvimento-e-caracterizacao-de-queijo-minas-curado-elaborado-com-leite-de-ovelha-78637n.aspx>>. Acesso em: 22 abr 2013.

NUDDA, A.; BATTACONE, G.; BOAVENTURA NETO, O.; CANNAS, A.; FRANCESCONI, A.H.D.; ATZORI, A.S.; PULINA, G. **Feeding strategies to improve ewe's milk and cheese quality**. In.: 50ª Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Campinas, 2013.

ONNI, T.; SANNA, G.; LARSEN, J.; TOLA, S. Antimicrobial susceptibilities and population structure of *Staphylococcus epidermidis* associated with ovine mastitis. **Veterinary Microbiology**. vetmic-4980, p.1-6, 2010.

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. 107f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa. 2009.



ORTOLANI, M.B.T.; YAMAZI, A.K.; MORAES, P.M.; VIÇOSA, G.N.; NERO, L.A. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.7, n.2, p. 175-180, 2010.

PANDYA, A.J.; GHODKE, K.M. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. **Small Ruminant Research**. v. 68, p. 193–206, 2007.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, n. 68, p. 88-113, 2007.

PEETERS, R.; BUYS, N.; ROBIJNS, L.; VANMONTFORT, D.; ISTERDAEL, J.V. Milk yield and milk composition of Flemish Milk sheep, Suffolk and Texel ewes and their crossbreeds. **Small Ruminant Research**, v.7, p.279-288, 1992.

PEIXOTO, R.M.; MOTA, R.A.; DA COSTA, M.M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 9, p. 754-762, 2010.

PELLEGRINI, L.G. **Caracterização do leite ovino em função do período de lactação**. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2012.

PELLEGRINI, L.G.; CASSANEGO, D.B.; GUSSO, A.P.; MATTANNA, P.; SILVA, S.V. Características físico-químicas de leite bovino, caprino e ovino. **Synergismus scyentifica UTFPR**. v. 7, n.1, 2012.

PERILLO, J.; CECCARELLI, D.; SPAGNOLETTI, M.; LOLLAI, S.; CAPPUCINELLI, P.; COLOMBO, M. M. Molecular characterization of enterotoxigenic and borderline oxacillin resistant *Staphylococcus* strains from ovine milk. **Food Microbiology**, 2012.

PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Surge/ Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192p.

PIRES, C.C.; MÜLLER, L.; GRIEBLER, L.; HASTENPFLUG, M.; WOMMER, T.P.; CARVALHO, S. Produção, qualidade do leite e desempenho de cordeiros de partos simples e duplo em pastagem de azevém. **Zootecnia Tropical**. v. 30, n. 2, p. 125-133. 2012.

PONCIANO, R.J.F. **Avaliação da qualidade higiênica da produção de leite de pequenos ruminantes e de queijo fresco da região do Rabaçal**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar). Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa.

PRADIEÉ, J. **Produção, composição e qualidade do leite de ovelhas Corriedale alimentadas com diferentes fontes de óleo**. 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

PRADIEÉ, J.; FERREIRA, O.G.L.; OSÓRIO, M.T.M.; CORRÊA, G.F.; KESSLER, J.D.; GONÇALVES, M. Efeito do óleo de arroz na ração sobre a produção e composição química do leite de ovelhas Corriedale. **Archivos de Zootecnia**. v. 61, n. 233, p. 153-156. 2012.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P. GUILLET, I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: an update. **Small Ruminant Research**, v.79, n.1, p.57-72, 2008.

RIBAS, N.P.; HARTMANN, W.; MONARDES, H.G.; ANDRADE, U.V.C. Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 2343-2350, 2004.

RIBEIRO, L.C.; PÉREZ, J. R.O.; CARVALHO, P.H.A.; SILVA, F.F.; MUNIZ, J.A.; JÚNIOR, G.M.O.; SOUZA, N.V. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.438-444, 2007.

ROHENKOHL, J.E.; CORRÊA, G.F.; AZAMBUJA, D.F.; PERREIRA, F.R. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Indicadores Econômicos FEE**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 97-114, 2011.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker. 632p, 1991.

SÁ, C.O.; SIQUEIRA, E.R.; SÁ, J.L.; FERNANDES, S. Influência do fotoperíodo no consumo alimentar, produção e composição do leite de ovelhas Bergamácia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.40, n.6, p. 601-608, 2005.

SANTANA, R.F.; SANTOS, D.M.; MARTINEZ, A.C.C.; LIMA, A.S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n.6, p.1517-1522, 2008.

SANTOS, M.V.; ARCARI, M.A. **Fatores que podem alterar a crioscopia do leite**. 2012. Milkpoint. Disponível em:< [http://www.milkpoint.com.br/mypoint/6239/p\\_fatores\\_que\\_podem\\_alterar\\_a\\_crioscopia\\_do\\_leite\\_4319.aspx](http://www.milkpoint.com.br/mypoint/6239/p_fatores_que_podem_alterar_a_crioscopia_do_leite_4319.aspx)>. Acesso em: 10 mai 2013.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria na Qualidade do Leite**. Barueri: Manole, 2007. 314p.

SANTOS, R.A.; MENDONÇA, C.L.; AFONSO, J.A.B.; SIMÃO, L.C.V. Aspectos clínicos e características do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 6-12, 2007.

SILVEIRA, P.R.; ABREU, L.R. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n.6, 2003.

SOUZA, A.C.K.O.; OSÓRIO, M.T.M.; OSÓRIO, J.C.S.; OLIVEIRA, N.M.; VAS, VAZ, C.M.S.; SOUZA, M.; CORRÊA, G.F. Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça Corriedale. **Revista Brasileira de Agrociências**. v. 11, n.1, p. 73-77, 2005.

TEJADA, T.S. SILVA, D.T.; DIAS, P.A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; MULLER NETTO, H.; TIMM, C.D. Mastite subclínica por *Staphylococcus coagulase negativa* em ovinos de corte.

**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v.64, n.4, p. 1074-1076, 2012.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 20, n. 3, p. 127-138. 2000.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** 2.ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2003.

VALLIN, V.M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A.P.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H.A.; SILVA, L.C.C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias.** v. 30, n. 1, p. 181-188, 2009.

VARAVALLO, M.A.; THOMÉ, J.N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde.** v. 29, n. 1, p. 83-104, 2008.

VITTORI, J.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; POIATTI, M.L.; PIGATTO, C.P.; CHIODA, T.P.; RIBEIRO, C.A.M.; GARCIA, G.R.; RAGAZANI, A.V.F. Qualidade microbiológica de leite UHT caprino: pesquisa de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. **Ciência Rural.** v. 38, n. 3, p. 761-765, 2008.

WIDYASTUT, Y.; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, A. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. **Food and Nutrition Sciences.** v. 5, p. 435-442, 2014.

YAMAZI, A.K.; MOREIRA, T.S.; CAVICCHIOLI, V.Q.; BURIN, R.C.K.; NERO, L.A. Long cold storage influences the microbiological quality of raw goat milk. **Small Ruminant Research.** v. 113, p. 205-210, 2013.

ZAFALON, L.F.; ESTEVES, S.N.; MACHADO, R.; MARTINS, K.B.; DIAS, W.A.F. **Microbiologia do leite de ovelhas em rebanho de corte.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento [Recurso eletrônico] Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 22p., 2010a.

ZAFALON, L.F.; ESTEVES, S.N.; MACHADO, R.; MARTINS, K.B.; DIAS, W.A.F. **Qualidade do leite ovino e sua influência no desenvolvimento de cordeiros.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 28 [Recurso eletrônico] Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 20p., 2010b.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF,** v.345, p. 15-18, 2000.

ZEPPENFELD, C.C.; PIRES, C.C.; MULLER, L.; CUNHA, M.A.; CARVALHO, S.; BANDEIRA, A.H. Produção e composição do leite ovino durante as sete primeiras semanas de lactação. **Zootecnia Tropical.** v. 2, p. 77-81, 2007.

ZIMMERMANN, N.P; MONREAL, A.C.D; OLIVEIRA, J.V; RASI, L. Controle leiteiro e análise centesimal do leite de ovelhas suffolk. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR.** v. 12, n. 1, p. 37-45, 2009.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DE OVELHA**

## RESUMO

O presente trabalho foi realizado em 15 propriedades com exploração da ovinocultura, localizadas no Distrito Federal. Com o objetivo de caracterizar a microbiota do leite de ovelha e avaliar a sua composição físico-química, foram analisadas 126 amostras de leite de ovelhas das raças Santa Inês (SI), Dorper (DP) e ovelhas leiteiras East Friesian e suas mestiças (EF x SI). Foram realizadas contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e detecção de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Os dados obtidos nas contagens foram analisados utilizando-se estatística descritiva e comparados às informações disponíveis na literatura. Foram verificados valores médios de pH, densidade e acidez Dornic, respectivamente de 6,69; 1,039 g/mL e 21,16 °D, e o índice crioscópico foi de -0,567 °H. A composição do leite ovino apresentou teores de 5,41% de gordura, 11,17% de sólidos não gordurosos, 5,04% de proteína e 5,25% de lactose. Em relação ao perfil microbiológico, foi encontrada média de  $5,6 \times 10^4$  UFC/mL para AM, presença de CT em 31,7% das amostras e contagem média  $1,15 \times 10^2$  UFC/mL, e *E. coli* em apenas 9,5%, com baixas contagens, média de 14,5 UFC/mL. Observou-se desenvolvimento de *S. aureus* em 39,2% das amostras de leite ovino, com contagens que variaram de 1,0 UFC/mL a  $4,2 \times 10^2$  UFC/mL, e média de 11,5 UFC/mL. Não foi observado desenvolvimento de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* nas amostras analisadas. A partir dos resultados obtidos é possível concluir que o leite de ovelhas da região do Distrito Federal, mesmo quando proveniente de animais de raças não especializadas, apresenta características físico-químicas e microbiológicas que conferem ao produto qualidade para o seu aproveitamento tecnológico na produção de queijos e outros derivados.

**Palavras-chave:** leite de ovelha, *Listeria*, micro-organismos indicadores, qualidade do leite, *Salmonella*.

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF THE PHYSICO-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PROFILE OF SHEEP MILK

This research was made in fifteen different rural properties located in the Distrito Federal with sheep production. Aiming for the characterization of the sheep milk microbiota, and the evaluation of its physico-chemical composition, 126 sheep milk samples of the following breeds were analyzed: Santa Inês (SI), Dorper (DP) and East Friesian dairy sheeps and its mixes (EF x SI). The method used was the count of mesophilic aerobic microorganisms (AM), total coliforms (CT), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. The results obtained in the counting were analyzed by the use of descriptive statistics and compared to the data found in the literature. The average levels of pH, density, and Dornic acidity were respectively 6.69; 1.039 g/mL and 21.16°D, with freezing point in -0.567°H. The sheep milk composition presented levels of 5.41% of fat, 11.17% of non-fatty solids, 5.04% protein, and 5.25% lactose. Regarding the microbiological profile, an average of  $5.6 \times 10^4$  UFC/mL to AM, presence of CT in 31.7% of the samples and average count of  $1.15 \times 10^2$  UFC/mL and *E. coli* in only 9.5% of the samples, with an average of 14.5 UFC/mL. It was observed the development of *S. aureus* in 39.2% of the sheep milk samples with counts that ranged from 1.0 UFC/mL to  $4.2 \times 10^2$  UFC/mL, with an average of 11.5 UFC/mL. No *Salmonella* spp. or *L. monocytogenes* were found in the analyzed samples. Based on the results obtained, it can be concluded that the sheep milk of the DF region, even when obtained from non-specialized races, presents microbiological and physico-chemical characteristics that grants the product the necessary quality to its use the dairy industry and technological potential.

**Keywords:** sheep milk, *Listeria*, indicator microorganisms, milk quality, *Salmonella*.

## 1 INTRODUÇÃO

O leite de ovelha possui características peculiares em relação ao sabor, aroma, e composição de gordura, proteína, aminoácido, lactose e ácidos graxos (Boyazoglu & Morand-Fehr, 2001; Haenlein & Wendorff, 2006). Considerado como importante alimento para o homem por apresentar teores médios de sólidos totais significativamente superiores quando comparado ao leite de vaca ou de cabra (Yuksel et al., 2012), o leite de ovelha é ideal para a fabricação de derivados lácteos, conferindo melhor rendimento para a indústria de laticínios (Guerra et al., 2008; Gajo 2010).

No Brasil, nota-se que o investimento na ovinocultura leiteira e a produção de derivados lácteos, estão em expansão na região Sul e Sudeste, especialmente pelo potencial de ampliação do consumo de queijos conforme descrito por Rohenkohl et al. (2011) e Novello & Preis (2012). Esse aumento da demanda por produtos lácteos, em especial os artesanais, criam excelentes oportunidades para pequenos e médios produtores que podem desta maneira, aumentar a renda proveniente do processamento em pequena escala, beneficiando-se das características específicas do leite ovino para produzir queijos especiais, iogurtes e outros derivados lácteos (Bencini & Pulina, 1997; Pellegrini, 2012). A exploração deste tipo de leite para a fabricação de queijos finos e fermentados tornou-se negócio promissor, e pesquisas demonstram que os consumidores brasileiros estão dispostos a investir mais em produtos de qualidade, saborosos e nutritivos (Celia et al., 2012).

Sabendo deste potencial tecnológico para a produção de queijos e fermentados, surge a necessidade de mais pesquisas a fim de se obter conhecimento sobre a composição do leite ovino, bem como melhorar os aspectos de produção e a qualidade dos produtos. As informações contribuirão para a criação de padrões regulamentares de qualidade, devido à falta de uma legislação específica para este leite no Brasil (Pandya & Ghodke, 2007).

Dessa forma e tendo em vista a carência de estudos sobre a qualidade do leite ovino da região, este trabalho objetivou a caracterização da qualidade físico-química e microbiológica do leite de ovelhas pertencentes a rebanhos do Distrito Federal (DF).



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo e coleta de amostras

A seleção das propriedades que participaram do estudo foi realizada a partir do banco de dados de ovinoculturas da região disponibilizado pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do DF (EMATER-DF, 2012) e Sindicato dos criadores de ovinos e caprinos do DF. Os estabelecimentos rurais foram categorizados considerando: tamanho do rebanho (até 200 animais), raças (Santa Inês (SI), Dorper (DP), East Friesian (EF) e seus cruzamentos), tipo de exploração (corte ou leite) e sistema de criação (animais em regime de pastejo e mantidos presos durante parte do dia para o consumo de concentrado comercial balanceado para a espécie). Foram selecionadas 15 propriedades que representassem as características de produção do DF, sendo majoritariamente a exploração de ovinos de corte e um único estabelecimento rural com atividade leiteira.

Sete fêmeas paridas foram selecionadas ao acaso de cada propriedade. Para os rebanhos de corte (das raças SI pura e DP pura) foi realizado apenas uma única visita em 14 propriedades, perfazendo 98 amostras. E as coletas de leite das ovelhas leiteiras (3/4 EF x 1/4 SI e 1/2 EF x 1/2 SI) foram realizadas em quatro visitas perfazendo 28 amostras.

Todas as fêmeas que participaram do estudo estavam entre a 2<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana de lactação, sem manifestação de mastite clínica e de diferentes idades. As coletas do leite foram realizadas diretamente da glândula mamária por ordenha manual, após o descarte dos três primeiros jatos, e em seguida, foi realizada a higienização dos tetos com álcool 70° GL. As fêmeas foram apartadas dos borregos por no mínimo seis horas

As amostras (aproximadamente 200 mL) foram coletadas assepticamente em frascos de vidros previamente esterilizados, e encaminhadas refrigeradas para o Laboratório de Análises de Leite e Derivados (LABLEITE), da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV), da Universidade de Brasília (UnB). As coletas foram realizadas durante o período de janeiro a novembro de 2013.

## 2.2 Análises físico-químicas

Para as análises físico-químicas foi utilizado o aparelho Ekomilk Total (EON trading) para avaliação dos teores de gordura, sólidos não gordurosos, proteína, lactose, densidade e pH. O índice crioscópico foi medido por aparelho Crioscópio M-90 (LAKTRON) e para a avaliação da acidez, foi utilizado o método titulométrico Dornic com solução de NaOH 0,1N (Brasil, 2006).

## 2.3 Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene

Todas as amostras foram homogeneizadas e submetidas a diluições decimais seriadas utilizando solução de NaCl (0,85%). A amostra integral e duas diluições (1:10; 1:100) foram semeadas para enumeração de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT) e *Escherichia coli*, utilizando-se o sistema Petrifilm™ AC e EC (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA), respectivamente, conforme orientações do fabricante e com base na metodologia proposta por Souza (2013).

Após incubação a 35°C por 48h, as colônias formadas foram enumeradas, sendo que nas placas Petrifilm™ AC foram contadas as colônias com coloração vermelha. No Petrifilm™ EC todas as colônias vermelhas e azuis com formação de gás foram enumeradas como CT, e *E. coli* somente as colônias azuis. O valor final obtido de acordo com a diluição considerada na contagem foi expresso em Unidade Formadora de Colônia (UFC/mL).

Para enumeração de *Staphylococcus aureus*, foi semeado 1,0 mL da amostra integral e da diluição 1:10 em Petrifilm™ Staph Express STX (3M Microbiology). Após incubação a 35°C por 24 h, quando observado desenvolvimento de colônias violetas essas foram contadas como *S. aureus*; quando observado desenvolvimento de colônias verdes ou negras, utilizou-se o disco Petrifilm™ Staph Express, com reincubação a 35°C por até 3 h. Após esse período as colônias com desenvolvimento de halo rosado, foram contadas e somadas ao valor da primeira contagem. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

## 2.4 Pesquisa de micro-organismos patogênicos

Para pesquisa de *Listeria monocytogenes*, empregou-se metodologia descrita por Wehr & Frank (2004), com modificações. Realizou-se a homogeneização de 5,0 mL de cada amostra em 45 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (Oxoid), com incubação a

35°C. Após 24 horas, alíquotas da cultura obtida foram estriadas em placas contendo Ágar Oxford (Oxoid) e Palcam (Oxoid), e incubadas a 35°C por 24 horas, em duplicata. Quando presentes, as colônias suspeitas de *Listeria* spp. foram semeadas em placas de Ágar Tripticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e incubadas a 35°C por 24-48h para análises bioquímicas específicas, de acordo com Pagotto et al. (2001).

A investigação da presença de *Salmonella* spp. foi realizada homogeneizando-se 10 mL da amostra em 90 mL de caldo lactosado (Oxoid), com incubação a 35°C por 24 horas. Em seguida, alíquotas de 1,0 e 0,1 mL foram transferidas respectivamente para caldo Tetrionato (Oxoid) (35°C por 24 horas) e Rappaport-Vassiliadis (Oxoid) (42°C por 24 horas). Após a incubação, alíquotas dos dois caldos foram estriadas, em duplicatas, em placas contendo Ágar MLCB (Oxoid) e Xilose Lisina Desoxicolato (Oxoid), e incubadas a 35°C por 24 horas. Quando presentes, colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram repicadas em tubos contendo Ágar Tríplice Açúcar Ferro (BD Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) e Lisina Ferro (BD), incubadas a 35°C por 24 horas para posterior análises bioquímicas específicas, com a confirmação por testes sorológicos utilizando antisoros polivalentes somático e flagelar (Probac) (Wehr & Frank, 2004, modificado).

## 2.5 Análise dos dados

Realizou-se a comparação das médias das características físico-químicas do leite de ovelhas de rebanhos de corte e ovelhas leiteiras, considerando que a maioria das variáveis não apresentou normalidade e homogeneidade de variância, utilizou-se análise não-paramétrica, o teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas utilizando-se o software free R (R Development Core Team, 2014).

Os dados obtidos nas contagens microbiológicas foram ajustados de acordo com as diluições e analisados utilizando-se estatística descritiva e comparados às informações disponíveis na literatura (Sampaio, 1998).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises para determinação do perfil físico-químico de leite de ovelha (n=126) estão contidos na Tabela 1 e representados pelos valores médios.

Tabela 1. Valores obtidos nas análises das características físico-químicas de leite de ovelhas de rebanhos do Distrito Federal.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± Desvio Padrão (n=126)</b>
Gordura (%)	5,41 ± 2,52
Sólidos não gordurosos (%)	11,17 ± 1,12
Proteína (%)	5,04 ± 0,98
Lactose (%)	5,25 ± 0,18
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,039 ± 0,006
pH	6,69 ± 1,40
Acidez (°D) <sup>1</sup>	21,16 ± 3,45
Índice crioscópico (°H) <sup>2</sup>	- 0,567 ± 0,013

<sup>1</sup>°D: graus Dornic; <sup>2</sup>°H: graus Hortvet

O teor médio de gordura determinado foi 5,41% ± 2,52, sendo superior ao reportado por Penna (2011) que relatou teor médio de 5,0% em rebanhos ovinos leiteiros de Minas Gerais (MG). Quando comparado a outras pesquisas, este valor é semelhante ao descrito por Zimmermann et al. (2009), que encontraram valor médio de 5,42% em leite de ovelhas da raça Suffolk, no estado de Mato Grosso do Sul (MS), e ao descrito por Gajo (2010) com leite de ovelhas Santa Inês (5,58%) em MG. Entretanto, ficou abaixo dos encontrados em pesquisas realizadas no Rio Grande do Sul (RS), por Brito (2004), Fava (2012) e Pellegrini et al. (2012) que encontraram valores médios de 5,79%, 8,10% e 7,21% respectivamente, na avaliação de animais de raças especializadas em produção de leite e adaptados ao manejo da ordenha. Em comparação com estudos realizados em outros países foi menor que o apresentado por Park et al. (2007) em trabalho de revisão (7,9%), Alexopoulos et al. (2011) em pesquisa com ovelhas na Grécia (6,17%) e Mayer & Fiechter (2012) na Áustria (5,75%).

Para SNG o teor médio de foi de  $11,17\% \pm 1,12$ , e comparado à literatura é superior aos relatos de Brito (2004) e Penna (2011) que descreveram  $10,43\%$  e  $10,49\%$  respectivamente, em ovelhas leiteiras criadas no RS e de Alexopoulos et al. (2011) que relataram média de  $10,95\%$ , em leite ovino produzido na Grécia.

A média dos teores de proteína foi de  $5,04\% \pm 0,98$ , estando próximo aos encontrados por Alexopoulos et al. (2011) de  $5,28\%$  e por Mayer & Fiechter (2012) de  $5,21\%$ . Contudo, está abaixo dos valores descritos por Park et al. (2007) de  $6,2\%$  e por Zimmermann et al. (2009) e Penna (2011) ( $5,80\%$  e  $5,41\%$ , respectivamente) em raças não especializadas em produção de leite. Gajo (2010) determinou teores mais elevados ( $7,74\%$ ) e a explicação do autor se baseia no fato de serem amostras de leite de período final de lactação, que elevaria o teor de proteína e de SNG devido à diminuição do volume. Na presente pesquisa, as amostras foram provenientes de ovelhas em diferentes estágios de lactação e de diferentes idades.

Para lactose o teor médio foi de  $5,25\% \pm 0,18$ , valor acima do descrito por Park et al. (2007) ( $4,9\%$ ) e observado nas pesquisas realizadas por Brito (2004) no estado do RS, Penna (2011) no estado de MG e por Zimmermann et al. (2009) no MS, que avaliaram amostras de leite de ovelhas Lacaune ( $4,76\%$ ), Santa Inês ( $4,61\%$ ) e Suffolk ( $4,15\%$ ), respectivamente.

A densidade média observada foi de  $1,039 \pm 0,006$ , próximo aos estudos realizados por Brito (2004) que descreveu valor médio de densidade para leite de ovelha de  $1,036 \text{ g/cm}^3$  e por Gajo (2010) que relatou valor de  $1,037 \text{ g/cm}^3$ . Esse alto valor médio de densidade encontrada se deve por este leite ser rico e concentrado, justificado pelos maiores teores de sólidos dissolvidos.

A acidez apresentou resultado médio de  $21,56 \text{ }^\circ\text{D} \pm 3,45$ . De acordo com Park et al. (2007) os valores de acidez para o leite ovino estão entre 22 e  $25 \text{ }^\circ\text{D}$ . Pellegrini (2012) avaliou amostras de leite de ovelhas meio sangue Lacaune e de ovelhas cruza Ile de France x Texel, no estado do RS, e observou valores médios de  $21,53$  e  $20,79 \text{ }^\circ\text{D}$ , respectivamente. Penna (2011) encontrou valores de acidez que variaram de  $20,42$  a  $23,35 \text{ }^\circ\text{D}$  em amostras de leite de ovelhas Lacaune, SI e mestiças. Brito (2004) e Gajo (2010) observaram média de acidez mais elevada, de  $25,13 \text{ }^\circ\text{D}$  e  $27 \text{ }^\circ\text{D}$  para ovelhas SI e ambos, relataram aumento significativo de acidez no final da lactação, o que poderia estar relacionado com maiores teores de proteína nesse período, em especial a caseína que é a principal proteína do leite, é uma fosfoproteína com características ácidas. Os resultados confirmam que o leite de ovelha naturalmente, apresenta valores de acidez mais elevados quando comparado ao leite de vaca, que apresenta uma faixa de variação entre 16 e  $18 \text{ }^\circ\text{D}$  (Fonseca & Santos, 2000), o que pode estar relacionado com os teores mais elevados de proteínas.

O valor médio do pH do leite das ovelhas analisadas foi de  $6,69 \pm 1,40$ , semelhante ao relatado por Souza et al. (2005) que encontraram média de pH de 6,7 em amostras de leite de animais da raça Corriedale, no estado do RS e condizente com o intervalo descrito por Park et al. (2007) (6,51 a 6,85). Mayer & Fiechter (2012) determinaram o pH do leite de ovelha de 6,59 e Gajo (2010) observou pH de 6,52, ambos descreveram que não houve diferença entre as médias durante a lactação, independentemente de raça, idade do animal e outros parâmetros que comumente estão associados a alterações na composição do leite.

Os resultados observados para o IC apresentaram média de  $-0,567$  °H. Este valor foi maior que o descrito por Park et al. (2007) que descreveram média de  $-0,570$  °C ( $-0,590$  °H) em trabalho de revisão, e por Penna (2011), que encontrou variação entre  $-0,575$  °H a  $-0,580$  °H em leite de ovelha de diferentes genótipos Lacaune, SI e mestiças dessas raças, porém, mais baixos do que encontrado por Mayer & Fiechter (2012) que foi de  $-0,544$  °H.

Apesar de não ser o foco desta pesquisa avaliar diferenças entre raças, os resultados obtidos demonstraram que as médias variaram significativamente entre os grupos genéticos estudados conforme Tabela 2. Os teores de gordura e lactose foram inferiores em leite de ovelhas de corte (SI e Dorper), enquanto SNG, proteína e densidade foram superiores quando comparados às ovelhas leiteiras (EF e suas mestiças). Em geral, as ovelhas de aptidão leiteira e as matrizes dos rebanhos de corte apresentaram ótimos valores de composição do leite, indicando uma grande adequação deste para a produção de derivados lácteos.

Tabela 2. Valores médios obtidos nas análises físico-químicas de amostras de leite de ovelhas de acordo com o tipo de exploração.

Parâmetros	Média $\pm$ DP Corte* (98)	Média $\pm$ DP Leite** (28)
Gordura (%)	$3,89^A \pm 2,379$	$6,03^B \pm 1,788$
SNG (%) <sup>1</sup>	$11,58^A \pm 1,002$	$10,96^B \pm 1,090$
Proteína (%)	$5,44^A \pm 0,873$	$4,83^B \pm 0,954$
Lactose (%)	$5,21^A \pm 0,228$	$5,28^B \pm 0,126$
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	$1,042^A \pm 0,005$	$1,038^B \pm 0,005$
pH	$7,03^A \pm 0,659$	$6,40^B \pm 1,637$
Acidez (°D) <sup>2</sup>	$21,29^A \pm 3,414$	$21,80^A \pm 2,931$
Índice crioscópico (°H) <sup>3</sup>	$-0,564 \pm 0,0167$	$-0,568 \pm 0,0107$

<sup>1</sup> SNG: Sólidos não gordurosos; <sup>2</sup> °D: graus Dornic; <sup>3</sup> °H: graus Hortvet; DP: Desvio padrão

\* Corte: Ovelhas de rebanhos de corte – Santa Inês (SI) e Dorper

\*\* Leite: Ovelhas de rebanhos leiteiros – East Friesian (EF) e seus cruzamentos (EF x SI)

\*\*\* Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Os resultados médios das contagens dos micro-organismos indicadores da qualidade higiênica e sanitária foram categorizados de acordo com os níveis de contaminação e estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3. Enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênica e sanitária em amostras de leite de ovelhas de rebanhos do Distrito Federal.

Níveis de contaminação UFC/mL	Aeróbios mesófilos (AM)	Coliformes totais (CT)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
≤ 1,0	0	86 (68,3)	114 (90,5)	73 (60,8)
1,1 – 10	6 (4,8)	27 (21,4)	10 (7,9)	23 (19,2)
1,1 x 10 <sup>2</sup> – 10 <sup>2</sup>	28 (22,2)	7 (5,6)	1 (0,8)	22 (18,3)
1,1 x 10 <sup>2</sup> – 10 <sup>3</sup>	51 (40,5)	2 (1,6)	0	2 (1,7)
1,1 x 10 <sup>3</sup> – 10 <sup>4</sup>	25 (19,8)	4 (3,2)	1 (0,8)	0
1,1 x 10 <sup>4</sup> – 10 <sup>5</sup>	8 (6,3)	0	0	0
> 10 <sup>5</sup>	8 (6,3)	0	0	0
Total	126 (100)	126 (100)	126 (100)	120 (100)

A enumeração de AM se apresentou bastante variável com contagens de 1,0 UFC/mL a 2,5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL, resultando em contagem média de 5,6 x 10<sup>4</sup> UFC/mL, sendo que a maior frequência observada (40,5%) foi de contagens entre 1,1 x 10<sup>2</sup> UFC/mL e 1,0 x 10<sup>3</sup> UFC/mL.

A contagem de AM é um indicador útil para monitorar as condições sanitárias e determinar a qualidade microbiológica inicial do leite, podendo variar significativamente, durante a produção, a coleta e o armazenamento. Contagens acima de 1,0 x 10<sup>5</sup> UFC/mL podem indicar deficiências de higiene na produção e, valores abaixo de 2,0 x 10<sup>4</sup> UFC/mL refletem boas práticas sanitárias (Chambers, 2002).

No Brasil, não existe regulamentação para o leite cru de ovelha, contudo, na comparação com o padrão do estado americano de Wisconsin, o qual preconiza para leite de conjunto, o máximo de 3,0 x 10<sup>5</sup> UFC/mL para o leite *grade B* e, 1,0 x 10<sup>5</sup> UFC/mL para o leite *grade A* de ovelha (Wisconsin Department of Agriculture, Trade and Consumer Protection, 2008) constatou-se média inferior de AM no leite de ovelhas criadas no DF, e alta frequência (87,3%) de amostras com contagens menores ou iguais a 1,0 x 10<sup>4</sup> UFC/mL.

Penna (2011) relata médias de contagens bacterianas totais (CBT) maiores, em pesquisa com leite coletado diretamente do úbere de ovelhas Lacaune puras (7,12 x 10<sup>5</sup> UFC/mL), ½ Lacaune x ½ SI (8,82 x 10<sup>5</sup> UFC/mL), ¾ Lacaune x ¼ SI (3,83 x 10<sup>5</sup> UFC/mL) e SI puras (1,19

x  $10^6$  UFC/mL). O autor concluiu que os resultados das elevadas médias de CBT podem estar associados às condições de criação das ovelhas em confinamento e pelo fato da ordenha ter sido realizada no aprisco, e não em uma sala adequada e exclusiva para este fim. Nesse trabalho as condições foram semelhantes, entretanto as contagens de AM foram menores, demonstrando qualidade microbiológica do leite pesquisado.

Na pesquisa de CT, 68,3% (86/126) das amostras apresentaram contagens < 1,0 UFC/mL; 21,4% contagens entre 1,1 e 10 UFC/mL; 5,6% contagens entre 11 e 100 UFC/mL e 4,8% entre 110 e  $10^4$  UFC/mL, resultando em média de  $1,15 \times 10^2$  UFC/mL. Contagens acima de  $10^2$  UFC/mL são consideradas indicativas de práticas de produção inadequadas e contaminação ambiental (Chambers, 2002). Para a coleta das amostras efetuou-se apenas higienização dos tetos com álcool 70°, secagem com papel toalha e eliminação dos três primeiros jatos, não sendo necessário realizar a lavagem dos tetos com água.

Em 90,5% das amostras não ocorreu desenvolvimento de colônias de *E. coli*. Nas demais, a contagem variou de 1,0 a 10,0 UFC/mL (7,9%) e de  $1,1 \times 10^3$  a  $10^4$  UFC/mL (0,8%), resultando em contagem média de  $1,45 \times 10$  UFC/mL. Segundo Franco & Landgraf (2005) essa bactéria é um micro-organismo comensal cujo habitat primário é a microbiota intestinal de mamíferos e animais de sangue quente. A sua presença em alimentos, indica deficiências na higiene da produção e fabricação, além de representar perigo à saúde, pois *E. coli* apresenta estirpes enteropatogênicas e/ou toxigênicas como *E. coli* O157: H7 responsável pela síndrome urêmica hemolítica (Jay, 2005; Mhone et al., 2011).

Com relação à pesquisa de *S. aureus*, observou-se desenvolvimento em 39,2% das amostras (47/120), com contagens que variaram de 1,0 UFC/mL a  $4,2 \times 10^2$  UFC/mL, e média de  $1,15 \times 10$  UFC/mL. Isolamento de *Staphylococcus* coagulase positivo frequentemente é relacionado como agentes de mastite clínica e subclínica em ruminantes leiteiros, tornando esse micro-organismo um contaminante comum do leite cru (Guaraná et al., 2009; Mhone et al., 2011; Bonnefont et al., 2012).

*S. aureus* quando em contagens acima de  $10^5$  UFC/mL/g pode representar um perigo à saúde no caso de serem enterotoxigênicos, já que as toxinas produzidas são termoresistentes, permanecendo ativas nos produtos beneficiados (Jay, 2005). As baixas contagens de *S. aureus* encontradas indicam ausência de perigo microbiológico relacionado.

*Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas, indicando ausência de perigo microbiológico relacionado. Estudos no Brasil relatam a ausência desses micro-organismos também em amostras de leite cru de origem bovina (Nero et al., 2004; Nero, 2005; Arcuri et al., 2006; Camargo, 2010; Tamanini et al., 2012).



As baixas contagens encontradas nesse estudo evidenciam a importância da adoção de boas práticas de ordenha já que a metodologia de coleta das amostras seguiu um protocolo de higienização adequado para evitar a incorporação de contaminação ambiental.

#### **4 CONCLUSÕES**

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que o leite de ovelhas da região do Distrito Federal, mesmo quando proveniente de animais de rebanhos não especializados, apresenta características físico-químicas e microbiológicas que conferem ao produto qualidade para o seu aproveitamento tecnológico na industrialização desse leite, como produção de queijos e outros derivados.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM™ - Guia de interpretação para contagem de *E.coli* e Coliformes, USA, 2009. Disponível em: [http://multimedia.3m.com/mws/mediawebsserver?mwsId=SSSSSu7zK1fslxtUnYtB58\\_1ev7qe17zHvTSevTSeSSSSSS-->](http://multimedia.3m.com/mws/mediawebsserver?mwsId=SSSSSu7zK1fslxtUnYtB58_1ev7qe17zHvTSevTSeSSSSSS-->). Acesso em: 14 set. 2012.

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM™ - Guia de interpretação para contagem de aeróbios, USA. Disponível em: <http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/ptBR/Microbiology/FoodSafety/> Acesso em: 14 set. 2012.

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM™ - Guia de interpretação para Contagem expressa de *Staphylococcus aureus*, USA. Disponível em: [http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/PT\\_BR/Microbiology/FoodSafety/](http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/PT_BR/Microbiology/FoodSafety/) Acesso em: 14 set. 2012.

ALEXOPOULOS, A.; TZATZIMAKIS, G.; BEZIRTZOGLU, E.; PLESSAS, S.; STAVROPOULOU, E.; SINAPIS, E.; ABAS, Z. Microbiological quality and related factors of sheep milk produced in farms of NE Greece. **Journal of the Anaerobe Society of the Americas**, n. 17, p. 276-279, 2011.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

BENCINI, R.; PULINA, G. The quality of sheep milk: A Review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 37, n. 5. 1997.

BONNEFONT, C.M.; RAINARD, P.; CUNHA, P.; GILBERT, F.B.; TOUFEER, M.; AUREL, M.R.; RUPP, R.; FOUCRAS, G. Genetic susceptibility to *S. aureus* mastitis in sheep: differential expression of mammary epithelial cells in response to live bacteria or supernatant. **Physiol Genomics**. v. 44, n. 7, p. 403-416, 2012.

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

BRASIL, Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**. ed. MAPA. Brasília, DF: Diário Oficial da União Federativa do Brasil, 14 de dezembro de 2006, seção 1, p.8-30, 2006.

BRITO, M.A. **Variação dos perfis metabólico, hematológico e lácteo em ovinos leiteiros na Serra Gaúcha**. 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004.

CAMARGO, T.M. **Prevalência de *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e *Escherichia coli* em leite cru refrigerado e ambiente de ordenha de propriedades leiteiras do Estado de São Paulo**. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2010.

CELIA, A.P.; MORAES, J.F.D.; SCHMIDT, V. Consumo de produtos lácteos de origem não bovina no Sul do Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 67, n. 357, p. 25-30, 2012.

CHAMBERS, J.V. The microbiology of raw milk. Chapte 2. In: Robinson, R.K., **Dairy Microbiology Handbook**. Wiley-Interscience, Danves. p. 39-90, 2002 .

EMATER-DF. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do DF. **Ovinocultura - Produtores e Rebanho 2012**. Acervo. 2012.

FAVA, L.W. **Caracterização físico-química do leite de ovelhas raça Lacaune e análise do rendimento de coalhada com caracterização física do soro obtido**. 2012. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

FONSECA, L.F.L. & SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. Lemos Editora, 2000. 175p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo: Editora Atheneu, 2005.182 p.

GAJO, A.A. **Caracterização do leite de ovelhas Santa Inês, Bergamácia e mestiças durante o período de lactação e avaliação tecnológica na elaboração de queijo similar ao Minas Padrão**. 2010. 108f. Dissertação (Mestrado dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras. 2010.

GUARANÁ, E.L.S.; SANTOS, R.A.; SILVA, N.S.; CAMPOS, A.G.S.S.; AFONSO, J.A.B.; MENDONÇA, C.L. Influência da mastite subclínica sobre as características físico-química do leite de ovelhas Santa Inês em diferentes fases da lactação: Estudo preliminar. **Ciência Animal Brasileira**. In: Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. Suplemento 1, p. 754-759. 2009.

GUERRA, I.C.D.; OLIVEIRA, C.E.V.; MAIA, J.M.; LIMA, F.A.; QUEIROGA, R.C. R.E.; OLIVEIRA, M.E.G.; BARBOSA, J.G.; FERNANDES, M.F.; SOUZA, E.D.; FILHO, E.C.P.; NETO, S.G. Análise comparativa da composição centesimal de leite bovino, caprino e ovino. In: Encontro de iniciação à docência, 10, 2008, UFPB, João Pessoa. Anais eletrônicos... Disponível em: <<http://www.prac.ufpb.br/anais/IXEnex/iniciacao/documentos/anais/6.SAUDE/6CCSDNMT10.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2011.

HAENLEIN, G.F.W.; WENDORFF, W.L. Sheep milk. Chapter 3. In: **Handbook of Milks of Non-bovine Mammals**. PARK, Y.W; HAENLEIN, G.F.W. ed. Blackwell Publishing, p. 137-194. 2006.

- JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 711p. 2005.
- MAYER, H.K.; FIECHTER, G. Physical and chemical characteristics of sheep and goat milk in Austria. **International Dairy Journal**. v. 24, p. 57-63, 2012.
- MHONE, T.A.; MATOPE, G.; SAIDI, P.T. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected small holder dairy farms of Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**. v.151, p.223-228, 2011.
- NERO, L.A. **Listeria monocytogenes e Salmonella spp em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção**. 2005. 141 p. Tese (Doutorado em Microbiologia de Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NETTO, D.P.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; WLADIMIR, P.S.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v, 35, p. 211-215, 2004.
- NOVELLO, Z.; PREIS, C. **Desenvolvimento e caracterização de queijo minas curado elaborado com leite de ovelha**. 2012. Disponível em: < <http://m.farmpoint.com.br/cadeia-produtiva/dicas-de-sucesso/desenvolvimento-e-caracterizacao-de-queijo-minas-curado-elaborado-com-leite-de-ovelha-78637n.aspx>>. Acesso em: 22 abr 2013.
- PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. 2011. **Health Canada's – Government of Canada**. Disponível em <<http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>> Acesso em: 11 abr. 2013.
- PANDYA, A.J. ; GHODKE, K.M. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. **Small Ruminant Research**. v. 68, p. 193–206, 2007.
- PARK. Y.W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, n. 68, p.88-113, 2007.
- PELLEGRINI, L.G. **Caracterização do leite ovino em função do período de lactação**. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2012.
- PELLEGRINI, L.G. ; CASSANEGO, D.B. ; GUSSO, A.P. ; MATTANNA, P. ; SILVA, S.V. Características físico-químicas de leite bovino, caprino e ovino. **Synergismus scyentifica**. v. 7, n. 1, 2012. Disponível em :<<http://revistas.utfpr.edu.br/pb/index.php/SysScy/article/View/1512/974>>. Acesso em: 29 abr. 2013.
- PENNA, C.F.A.M. **Produção e parâmetros de qualidade de leite e queijos de ovelhas Lacaune, Santa Inês e mestiças submetidas a dietas elaboradas com soja ou linhaça**. 2011. 154f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>

ROHENKOHL, J.E.; CORRÊA, G.F.; AZAMBUJA, D.F.; PERREIRA, F.R. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Indicadores Econômicos FEE**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 97-114, 2011.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. UFMG, Belo Horizonte. 1998. 221p.

SOUZA, L.M.J. **Avaliação do sistema Petrifilm™ na enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária e patogênicos no leite de origem ovina**. 2013. 36p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013.

SOUZA, A.C.K.O.; OSÓRIO, M.T.M.; OSÓRIO, J.C.S.; OLIVEIRA, N.M.; VAS, VAZ, C.M.S.; SOUZA, M.; CORRÊA, G.F. Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça Corriedale. **Revista Brasileira de Agrociências**. v. 11, n.1, p. 73-77, 2005.

TAMANINI, R.; BELOTI, V.; SILVA, L.C.C.; ANGELA, H.L.; YAMADA, A.K.; BATTAGLINI, A.P.P.; FAGNANI, R.; MONTEIRO, A.A. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 33, n. 5, p. 1877-1886, 2012.

WEHR, H.M.; FRANK, J.F. **Standard methods for the examination of dairy products**. American Public Health association, Washington. 570p. 2004.

WISCONSIN DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Trade and Consumer Protection. 2008. Chapter ATCP60 Dairy Farms. Pages 411–430 in Wisconsin Register April 2008, No. 628.

YUKSEL, Z.; AVCI, E.; UYMAZ, B.; ERDEM, Y.K. General composition and protein surface hydrophobicity of goat, sheep and cow milk in the region of Mount Ida. **Small Ruminant Research**, 2012.

ZIMMERMANN, N.P; MONREAL, A.C.D; OLIVEIRA, J.V; RASI, L. Controle leiteiro e análise centesimal do leite de ovelhas suffolk. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 37-45, 2009.

### **CAPÍTULO 3**

## **IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E POTENCIAL ANTAGONISTA DA MICROBIOTA LÁTICA AUTÓCTONE DE LEITE DE OVELHA**

## RESUMO

Com a exigência dos consumidores por produtos minimamente processados e, com menos conservantes químicos, diversas pesquisas buscam caracterizar bactérias ácido lácticas que possuam atividade antimicrobiana e potencial de uso como bioconservador. O leite de ovelhas apresenta alto valor nutricional e comercial e possui maiores teores de sólidos totais quando comparado ao leite de vaca e cabra, resultando em melhor rendimento na produção de queijos e de outros derivados lácteos. Este estudo objetivou a enumeração, a identificação molecular, a caracterização do potencial antagonista e a atividade bacteriocinogênica da microbiota láctica autóctone presente no leite de ovelhas de rebanhos do Distrito Federal. Foram coletadas 126 amostras de leite cru de ovelhas e 78 isolados de BAL foram testados quanto ao potencial antagonista frente a quatro cepas de *Listeria monocytogenes*, quatro cepas *Staphylococcus aureus* e uma cepa de *Lactobacillus sakei*; em seguida, com base nos perfis dos produtos de reação de Rep-PCR esses isolados foram submetidos ao sequenciamento genético. Também foi avaliada a atividade bacteriocinogênica desses isolados. Observou-se desenvolvimento de BAL em 80,2% (101/126) das amostras analisadas, com contagem média de  $2,25 \times 10^3$  UFC/mL. Os resultados mostraram que os isolados apresentaram reação de antagonismo contra os microorganismos testados e o sequenciamento do gene 16S rRNA identificou 33 *Lactococcus lactis* e um *Lactococcus garvieae*; 32 isolados como *Enterococcus* spp.; 10 isolados como *Pediococcus pentosaceus* e dois isolados de *Streptococcus salivarius*. *Lactococcus lactis*. apresentou maior frequência de inibição contra *S. aureus* comparado à *L. monocytogenes*. Nenhum isolado apresentou produção de bacteriocinas, sugerindo que a atividade antagonista possa estar relacionada à produção de outras substâncias. A diversidade de BAL encontrada indica que o leite de origem ovina da região, mesmo quando proveniente de raças não especializadas, apresenta potencial tecnológico e antagonista sendo que mais pesquisas são necessárias a fim de investigar, mais detalhadamente, essa microbiota.

**Palavras-chave:** ação inibitória, bactérias lácticas, leite de ovelha, *L. monocytogenes*, sequenciamento genético



## ABSTRACT

### MOLECULAR IDENTIFICATION AND ANTAGONIST POTENTIAL OF AUTOCHTHONOUS LACTIC MICROBIOTA OF SHEEP MILK

With the growing demand for minimally processed products and with less chemical preservatives, several researches aim for the characterization of acid lactic bacteria with antimicrobial activity, and its potential as a biopreservative. Sheep milk presents high nutritional and commercial value, and highest levels of total solids if compared to goat milk and cow milk, allowing a better income in the dairy production. This research focused on the enumeration, molecular identification, characterization of the antagonist potential and the bacteriocinogenic activity of the autochthonous lactic microbiota in the sheep milk of the DF. One-hundred and twenty-six samples of raw sheep milk were collected and 78 isolated LAB were tested to its antagonist potential against four strains of *Listeria monocytogenes*, four strains of *Staphylococcus aureus*, and one strain of *Lactobacillus sakei*; then, based on the Rep-PCR reaction profiles of the products, these isolated were submitted to genetic sequencing. Their bacteriocinogenic activity was also analyzed. Analysis showed development of LAB in 80.2% (101/126) of the samples, with an average count of  $2.25 \times 10^3$  UFC/mL. The results also showed that the isolated showed reaction of antagonism against the tested microorganisms, and the sequencing of the gene 16S rRNA identified 33 *Lactococcus lactis* and one *Lactococcus garviae*, 32 isolated as *Enterococcus* spp., 10 isolated as *Pediococcus pentosaceus* and two isolated of *Streptococcus salivarius*. *Lactococcus lactis* showed the higher microbial activity against *S. aureus* compared to *L. monocytogenes*. No isolated showed production of bacteriocins, suggesting that the antagonist activity might be related to the production of other substances. The diversity of LAB found indicates that the regional sheep milk, even when originated from non-specialized herds, has technological and antagonist potential, being that more research is necessary to investigate, with more details, this microbiota.

**Keywords:** inhibitory action, lactic bacteria, sheep milk, *L. monocytogenes*, genetic sequencing

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil existe um potencial latente para a produção e processamento do leite de ovelha, principalmente na fabricação de produtos lácteos, em função do seu alto valor nutricional e comercial (Rohenkohl et al., 2011). A ampliação do consumo de queijos no país e a expansão do sistema de mercado desse tipo de leite têm gerado um negócio promissor, principalmente nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Boyazoglu & Morand-Fehr, 2001; Celia et al., 2012; Novello & Preis, 2012).

Bactérias ácido lácticas (BAL) são amplamente utilizadas na tecnologia de fabricação de diversos produtos lácteos como iogurtes, cremes, queijos frescos e maturados, pois, o seu metabolismo gera a produção de diversas substâncias que conferem sabores, odores e texturas específicas. Esses micro-organismos apresentam a capacidade de produzir ácido lático a partir dos açúcares do leite pelo processo de fermentação e são constantemente isoladas de diferentes alimentos, buscando o isolamento de cepas que podem ser usadas como potenciais culturas *starters* em alimentos fermentados (Axelsson, 2004).

Estudos comprovam o potencial probiótico de diversas BAL que propõem melhorias à saúde do consumidor, conhecidas pela produção de várias substâncias antimicrobianas (Holzapfel et al., 2001; Deegan et al., 2006; Pfeiler & Klaenhammer, 2007). Também são utilizadas como agentes de conservação de alimentos, geradores de aromas e formação da textura nos produtos lácteos fermentados (Franciosi et al., 2009; Medina et al., 2011; Delavenne et al., 2012; Widyastuti et al., 2014), razão pela qual, a indústria de alimentos tem demonstrado interesse em pesquisas de caracterização de BAL.

A produção de derivados, como queijos e fermentados, está diretamente relacionada com a ação desses micro-organismos (Delavenne et al., 2012), pois são consideradas como base biológica para a produção de um grande número de alimentos fermentados (Lasagno et al., 2002; Dal Bello et al., 2010). BAL são um grupo de micro-organismos Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que geralmente crescem sob condições microaerófilas ou estritamente

anaeróbicas. Os mais importantes gêneros são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissela*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (Axelsson, 2004; Kondyli et al., 2012).

O metabolismo natural de BAL resulta na produção de diversas substâncias com potencial antimicrobiano como ácidos orgânicos (principalmente láctico, acético e propiônico), além de peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono e bacteriocinas (Naidu et al., 1999). Essas substâncias produzidas e diversos mecanismos como competição por oxigênio, nutrientes e sítios de ligação, sensibilidade às interações microbianas, que exercem ação inibitória ao desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, é conhecida como atividade antagonista (Nero et al., 2008a; Ortolani et al., 2010).

Atualmente os consumidores exigem cada vez mais produtos naturais, com menos conservantes químicos, assim estudos estão sendo continuamente conduzidos para identificar e caracterizar novas BAL com este potencial de uso bioconservador. Assim, uma vez caracterizado o potencial de inibição das BAL estas poderão ser aproveitadas de forma adequada pela indústria de alimentos, exploradas comercialmente na preservação e extensão da vida útil dos alimentos a fim de garantir segurança microbiológica em leite e derivados, além de outros produtos (Deegan et al., 2006; Ortolani, 2009).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo enumerar e caracterizar a microbiota láctica autóctone presente no leite de ovelha de rebanhos do Distrito Federal, com vistas a avaliar o seu potencial para a exploração tecnológica em produtos lácteos, assim como verificar as atividades antagonista e bacteriocinogênica desta microbiota.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta de amostras**

Amostras de leite cru de ovelhas foram coletadas em condições assépticas em 15 propriedades com exploração de ovinos localizadas no Distrito Federal, totalizando 126 amostras, em 18 coletas.

Fêmeas paridas foram selecionadas ao acaso das raças Santa Inês (SI) pura, Dorper pura, East Friesian (EF) pura e cruzas EF x SI (3/4 EF x 1/4 SI e 1/2 EF x 1/2 SI) de diferentes idades, entre a 2<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana de lactação.

As coletas foram realizadas nas áreas destinadas ao manejo dos animais e as fêmeas apartadas dos borregos por no mínimo seis horas. As amostras de leite foram coletadas em frascos esterilizados e identificados, diretamente do úbere das fêmeas e de acordo com as boas práticas, que consistiram: desprezar os três primeiros jatos, higienização dos tetos das ovelhas com álcool 70°GL e secagem dos tetos com papel toalha. As amostras foram mantidas refrigeradas e encaminhadas ao Laboratório de Análises de Leite e Derivados, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília, onde foram realizadas as análises de enumeração e caracterização fenotípica das bactérias ácido lácticas (BAL) autóctones do leite.

### **2.2 Enumeração e isolamento de bactérias ácido lácticas**

A partir de cada amostra integral de leite e após completa homogeneização, foram realizadas diluições decimais seriadas (1:10; 1:100) utilizando caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, India), sendo 65 amostras semeadas no sistema Petrifilm™ AC (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA) conforme Nero et al. (2006) e, 61 amostras semeadas em

profundidade em ágar MRS em duplicata. Todas as placas foram acondicionadas em jarras com geradores de anaerobiose (GasPak™ EZ Anaerobe Container System, BD) e incubadas a 35°C por 72 horas (Nero et al., 2008b; Souza, 2013). Após o período de incubação, as colônias formadas foram enumeradas e o valor final corrigido de acordo com a diluição considerada e os resultados expressos em Unidade Formadora de Colônia (UFC/mL).

Colônias foram retiradas das placas contendo meio MRS, e purificadas neste mesmo ágar. Após desenvolvimento foram submetidas ao teste de catalase e de coloração de Gram; ao todo 78 culturas características de BAL – cocos ou bacilos Gram positivos e catalase negativa – foram repicadas em ágar MRS, incubadas a 35°C por 24 a 48 horas e mantidas em estoques a 4°C (Downes & Ito 2001; Salminen et al., 2004).

## **2.3 Identificação genotípica**

### **2.3.1. Extração de DNA e Rep-PCR**

Essa etapa do experimento foi realizada no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (InsPOA) e Laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL) do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV). 78 isolados foram recuperados em 4,0 mL de caldo MRS com incubação a 35°C *overnight*. Alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para tubos tipo eppendorf e centrifugadas a 15.000 x g por 3 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o DNA de cada cultura foi extraído de acordo com o protocolo do Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, EUA).

O Rep-PCR fingerprinting foi realizado com primer (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG – 3') (Versalovic et al., 1994; Gevers et al., 2001). As reações de PCR continham 12,5µL Mix PCR (Go Taq Green Master Mix 2x, Promega), 1µL do primer na concentração de 50 pMol, 2µL de DNA e água livre de DNA (Promega) até completar o volume de 25µL. A amplificação da reação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 30s, seguidos de 30 ciclos de 40°C durante 30s e 65°C durante 8 minutos, e extensão final a 65°C por 16 minutos (Dal Bello et al., 2010).

Os produtos da reação de Rep-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% durante duas horas em uma voltagem constante de 110 V em tampão 0.5 x Tris/Borato/EDTA (TBE), utilizando 1 Kb DNA como marcador de peso molecular (Invitrogen) e corados utilizando GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). Os perfis de Rep-PCR foram visualizados sob luz ultravioleta, e a imagem capturada utilizando o

transiluminator LPIX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil). As imagens foram analisadas pelo software BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Os isolados foram agrupados para identificação, a similaridade entre os perfis foi determinada usando a correlação de Pearson e o dendrograma construído utilizando Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).

### 2.3.2 Sequenciamento

Baseado nos perfis gerados pela técnica de Rep-PCR, foram selecionados 19 isolados para pesquisa do gene 16S rRNA, por PCR utilizando os primers P1V1 e P4V3; as reações de PCR continham 25µL de GoTaq Green Master Mix 2x (Promega), 1µL de cada primer 10 pMol, 2 µL de DNA e água livre de DNA até completar o volume final de 50 µL e processadas conforme descrito por Klijn et al. (1991).

Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento na Macrogen Inc. (Seoul, Korea) e as sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information (GenBank) (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o Basic AlignmentSearch Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 2.4 Atividade antimicrobiana

### 2.4.1 Micro-organismos utilizados

Os testes de antagonismos foram realizados com os 78 isolados no INSPOA-UFV, conforme metodologia preconizada por Ortolani (2009) e Moraes et al. (2010), sendo utilizado como indicadores nos testes cepas patogênicas de referência e isolados de campo, conforme Tabela 1. Em todas as placas, uma alíquota de 1,0 µL da cultura de *Lactobacillus sakei* 2a foi semeada como controle positivo de BAL bacteriocinogênica (de Martinis & Franco, 1998).

Tabela 1. Micro-organismos alvo utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de ovelhas.

Micro-organismos alvo	Testes realizados	Procedência
<i>L. monocytogenes</i>	Potencial antagonista e ensaio bacteriocinogênico	ATCC 7644
<i>L. monocytogenes</i>	Potencial antagonista	ATCC 15313
<i>L. monocytogenes</i> “Scott A”	Potencial antagonista	ATCC 49594
<i>L. monocytogenes</i> 537 - isolado de carcaça bovina	Potencial antagonista e ensaio bacteriocinogênico	InsPOA/UFV***

<i>L. monocytogenes</i> 211 - isolado de campo de carcaça de frango	Ensaio bacteriocinogênico	InsPOA/UFV***
<i>L. monocytogenes</i> 409 - isolado de carcaça de frango	Ensaio bacteriocinogênico	InsPOA/UFV***
<i>L. monocytogenes</i> Lm 60	Ensaio bacteriocinogênico	Barros et al. (2007)
<i>Listeria innocua</i> Li 76	Ensaio bacteriocinogênico	Barros et al. (2007)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Potencial antagonista e ensaio bacteriocinogênico	ATCC 25293
<i>Staphylococcus aureus</i>	Potencial antagonista e ensaio bacteriocinogênico	ATCC 12598
<i>Staphylococcus aureus</i>	Potencial antagonista	ATCC 12600
<i>S. aureus</i> 26BP6 - isolado de queijo	Potencial antagonista e ensaio bacteriocinogênico	InsPOA/UFV***
<i>Lactobacillus sakei</i> *	Potencial antagonista e ensaio bacteriocinogênico	ATCC 15521
<i>Lactobacillus sakei</i> **	Potencial antagonista	2a
<i>Enterococcus</i> 3M4	Ensaio bacteriocinogênico	InsPOA/UFV***
<i>Lactococcus lactis</i> 13Lc2	Ensaio bacteriocinogênico	InsPOA/UFV***

\* *L. sakei* ATCC 15521: conhecida como cepa sensível a substâncias antagonistas.

\*\* *L. sakei* 2a: controle positivo de BAL bacteriocinogênica.

\*\*\* InsPOA/UFV – Coleção de culturas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

#### 2.4.2 Potencial antagonista

Para as culturas de BAL a recuperação foi realizada em caldo MRS, para os isolados de *Listeria* em caldo Trypticase de Soja (TSB) e para *S. aureus* utilizou-se caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), com incubação a 35°C por 24 h. As culturas foram submetidas ao protocolo *spot-on-the-lawn* para avaliação do perfil antagonista, que consistiu em inocular 1,0 µL da cultura recuperada em placas contendo ágar MRS modificado com 0,5% de dextrose com incubação a 25°C por 24 h em anaerobiose. Depois deste período cada placa recebeu uma sobrecamada de 8,0 mL de MRS, BHI ou TSB em meio semi-sólido (contendo ágar a 0,8%), de acordo com o micro-organismo indicador utilizado, respectivamente, *L. sakei* ATCC 15521, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, inoculados na concentração aproximada de 10<sup>5</sup> UFC/mL conforme escala de Mac Farland dos micro-organismos alvos. *L. sakei* ATCC 15521 foi utilizada como controle positivo de sensibilidade às substâncias antagonistas produzidas por BAL.

Após a solidificação, as placas foram incubadas a 35°C por 24h, e avaliadas quanto à formação de halos de inibição ao redor das colônias de BAL semeadas. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados com auxílio de paquímetro e expressos em milímetros (mm). A presença de halos de inibição foi registrada como atividade antimicrobiana do isolado testado.

### 2.4.3 Avaliação da atividade bacteriocinogênica de isolados do leite ovino

Isolados de BAL que apresentaram inibição no teste *spot-on-the-lawn* foram avaliados quanto a produção de bacteriocinas. Os isolados selecionados foram cultivados em caldo MRS a 37°C por 18 h e o sobrenadante livre de células foi obtido por centrifugação da suspensão celular (6.800 g por 20 min a 4°C). Os sobrenadantes tiveram o pH corrigido a 6.0 com NaOH 1M e foram aquecidos a 80°C por 10 min, para inativação de proteases extracelulares e peróxido de hidrogênio. Em seguida, foram esterilizadas por filtração (0.22 µm *pore size filter-units*, Merck Millipore Ltd., Cork, Ireland) e os extratos obtidos foram submetidos ao método de diluição crítica (Mayr-Harting et al., 1972; Bromberg et al., 2006) em Tampão Fosfato de Sódio 10 mM, pH 6.5. O perfil bacteriocinogênico foi avaliado contra os micro-organismos listados na Tabela 1. A atividade foi testada utilizando o teste agar-spot (Todorov, 2008) e expressa como Unidades Arbitrárias (UA/mL), calculada como  $a^b \times 100$ , em que “a” corresponde ao fator de diluição e “b”, corresponde a última diluição que produz zonas de inibição maiores que dois mm de diâmetro (Schirru et al., 2012).

### 2.5 Análise dos dados

As frequências de isolados de BAL com atividade antagonista foram calculadas considerando a sensibilidade às substâncias produzidas pelas culturas de BAL e a atividade inibitória sobre os micro-organismos alvos. Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva e não paramétrica.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram desenvolvimento de BAL em 80,2% (101/126) das amostras analisadas, com contagens que variaram de zero a  $7,8 \times 10^4$  UFC/mL, resultando em média de  $2,25 \times 10^3$  UFC/mL. Observou-se que 41,2% das amostras apresentaram contagens entre  $1,1 \times 10^2$  e  $10^5$  (Tabela 2), indicando que o leite ovino da região apresenta uma microbiota de grande importância para indústria de laticínios com possibilidades de exploração tecnológica em produtos lácteos.

Os achados desse estudo foram superiores aos relatos de Aziz et al. (2009), que verificaram presença de BAL em 55% (22/40) de amostras de leite de origem ovina no Paquistão e de Souza (2013), que observou frequência de 36,6% (11/30) no Distrito Federal.

Tabela 2. Resultados da enumeração de bactérias ácido láticas em amostras de leite ovino cru, coletadas de ovelhas de rebanhos do Distrito Federal.

	Enumeração de bactérias ácido láticas					
	UFC/mL					
	<1,0	1,1 - 10	$1,1 \times 10^2 - 10^2$	$1,1 \times 10^2 - 10^3$	$1,1 \times 10^3 - 10^4$	$1,1 \times 10^4 - 10^5$
n (%)	25 (19,8)	16 (12,7)	33 (26,2)	31 (24,6)	13 (10,3)	8 (6,3)

n: número de amostras com desenvolvimento de BAL.

A contagem média de BAL foi superior se comparada às médias relatadas por Acurcio (2011) em leite cru de ovelhas Santa Inês ( $2,0 \times 10$  UFC/mL), e inferior ao leite de ovelhas mestiças (½ Lacaune e ½ SI) ( $4,42 \times 10^4$  UFC/mL) e amostras do leite de ovelhas Lacaune ( $4,6 \times 10^5$  UFC/mL) criadas em Minas Gerais, demonstrando que o leite de ovelhas de aptidão leiteira e suas mestiças têm maior predominância de BAL que o de ovelhas da raça SI. O autor concluiu que a maior tradição leiteira da raça Lacaune provavelmente está associada a maiores contagens de bactérias láticas no seu leite e no de suas mestiças. Contudo, nesta pesquisa avaliou-se a microbiota láctica autóctone de animais não especializados em produção de

leite e ovelhas mestiças constatando alta frequência e contagem média de BAL confirmando o potencial tecnológico deste leite.

A partir da etapa de enumeração, 78 colônias coletadas aleatoriamente, apresentaram resultados negativos para o teste da catalase e foram identificadas como cocos Gram positivos. Ortolani (2009) em Minas Gerais e Franciosi et al. (2009) na Itália, verificaram predominância de cocos sobre bacilos de isolados de BAL em amostras de leite bovino. Enquanto, Meira et al. (2010) isolaram e identificaram apenas bacilos em amostras de leite ovino cru e de queijo de ovelha no Rio Grande do Sul.

Por meio de técnica de Rep-PCR esses isolados foram agrupados em 12 padrões distintos, considerando similaridade acima de 80% (Figura 1). Após, BAL representativas de cada grupo foram submetidas à reação de PCR, com base na região conservada do gene 16S rRNA, confirmando como pertencentes ao grupo de BAL conforme preconizado por Dal Bello et al. (2010) (Figura 2).

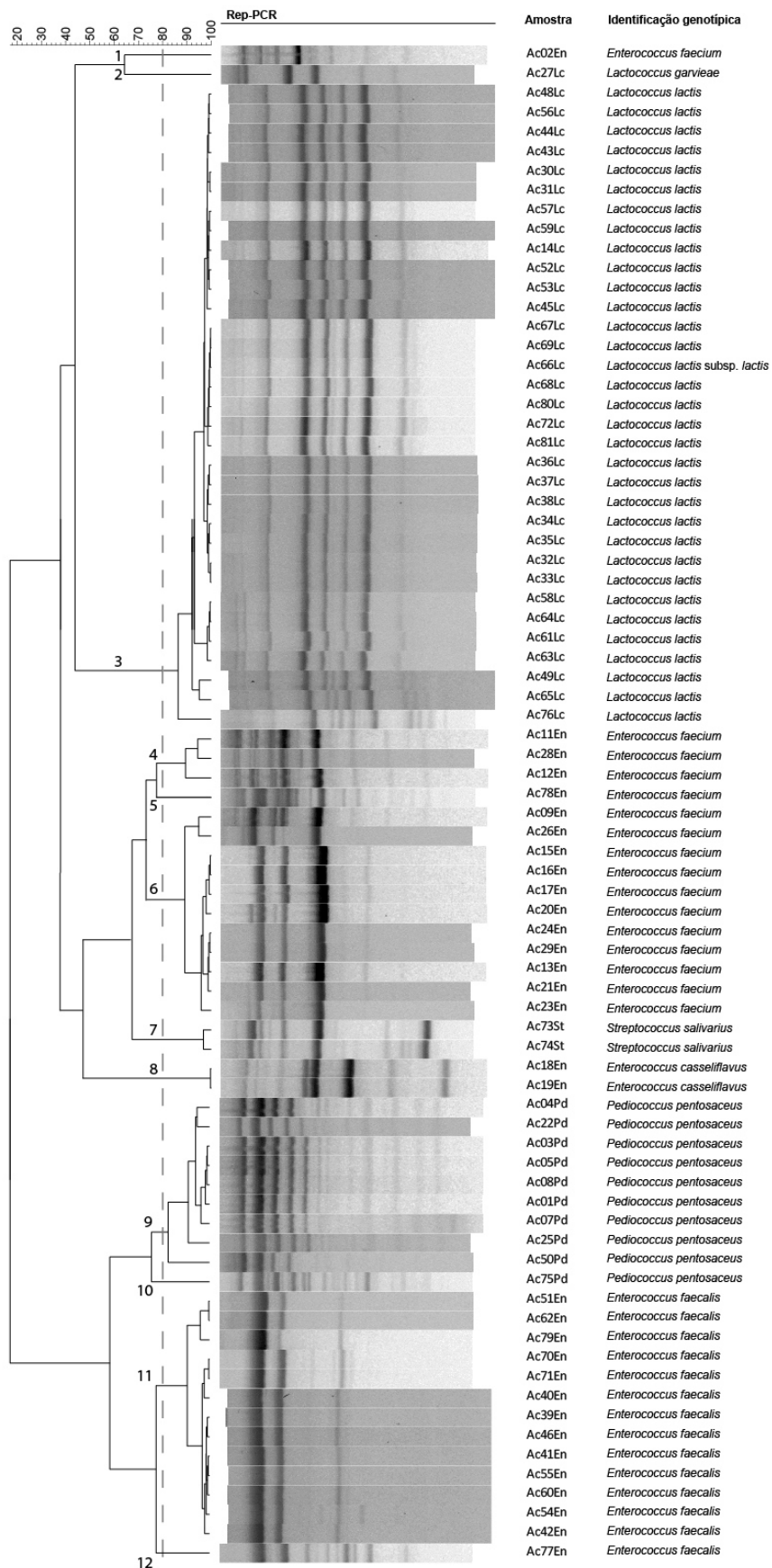


Figura 1. Dendrograma gerado após a análise de impressões Rep-PCR das culturas de BAL isoladas de amostras de leite ovino cru e sua identificação genotípica.

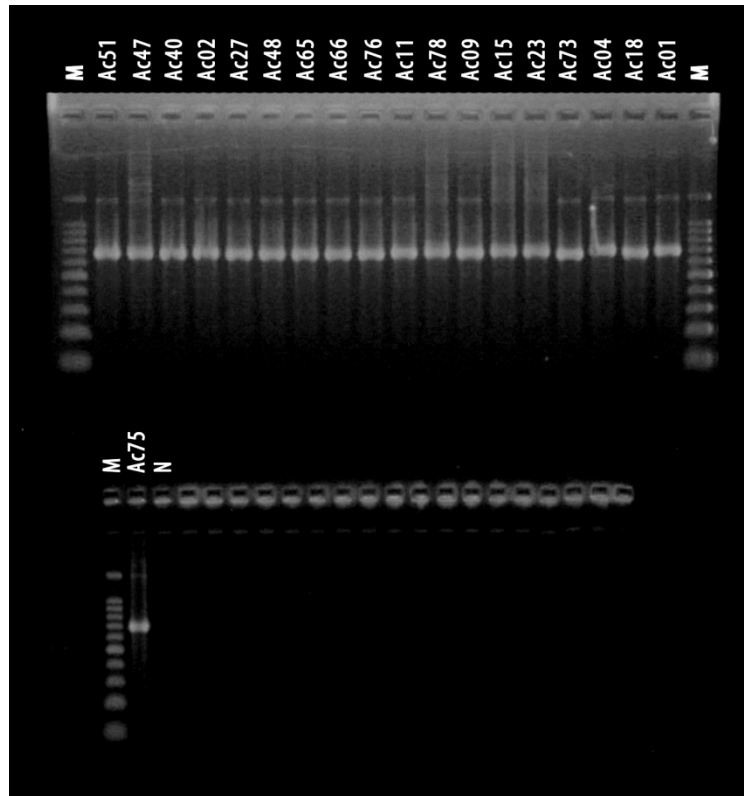


Figura 2. Produto de PCR do gene 16S rRNA evidenciados por eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando-se primers P1V1 e P4V3 (M: marcador de 100 pb; N: controle negativo).

O sequenciamento genético identificou os isolados como: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus* spp., *Pediococcus pentosaceus* e *Streptococcus salivarius* (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação dos isolados de BAL (n=78) por sequenciamento do gene 16SrRNA.

Bactéria láctica isolada	Nº de isolados	Frequência (%)
<i>Lactococcus lactis</i>	32	41,0
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	1,3
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	1,3
<i>Enterococcus faecium</i>	16	20,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	14	17,9
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2	2,6
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	10	12,8
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	2,6
<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>100</b>

n: número de amostras

*Lactococcus lactis* foi identificado com maior frequência (42,3%) entre os isolados. Consiste em um micro-organismo relevante para a indústria laticinista, utilizado na fabricação de leites fermentados, bebidas lácteas fermentadas e queijos, devido à produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos responsáveis por conferir características específicas, de sabor e aroma, nesses produtos (Saarela & Mattila-Sandholm, 2007). *Lactococcus* também foi relatado como o gênero predominante em amostras de leite cru de ovelhas (68%) em pesquisas conduzidas por Aziz et al. (2009) no Paquistão e, em amostras de leite de vaca e de queijos de diferentes estágios de maturação, por Dolci et al. (2008) na Itália e por Rodríguez et al. (2000) na Espanha. Terzic-Vidojevic et al. (2014) identificaram 36,7% de *Lactococcus* spp. em produtos lácteos. Entre os lactococos foram identificados *L. lactis* subsp. *lactis* (1,3%) e *L. garvieae* (1,3%).

*Enterococcus* spp. foi identificado como o segundo gênero mais frequente (41%). A predominância dos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* também foi relatada em isolados de leite cru, produtos derivados de leite cru e queijos artesanais produzidos a partir de leite de ovelhas e cabras na Argentina (Medina et al., 2011). Em pesquisas realizadas em MG, Moraes et al. (2013) observaram *Enterococcus* spp. como o gênero mais frequente de culturas bacteriocinogênicas isoladas de amostras de leite e queijo de origem bovina e Acurcio et al. (2014) isolaram apenas o gênero *Enterococcus* em amostras de leite ovino, não identificando nenhuma outra espécie de BAL, como *Lactobacillus* spp.

Ao considerar a figura do dendograma observou-se a presença de isolados com características genéticas similares, porém distribuídos em agrupamentos distintos (grupos 1, 4, 5 e 6) e todos identificados como *E. faecium*, demonstrando que o sequenciamento genético determinou uma grande variabilidade entre os isolados (Figura 1).

Propriedades tecnológicas de *E. faecium* e *E. faecalis* como culturas iniciadores de produtos lácteos fermentados e na fabricação de queijos, foram relatadas por Giraffa (2007); as propriedades probióticas foram avaliadas por Acurcio et al. (2014).

Dois isolados (2,6%) foram identificados como *E. casseliflavus*. Acurcio et al. (2014) descreveram que este micro-organismo isolado a partir de leite de ovelha apresentou propriedades probióticas, tais como resistência ao suco gástrico, aos sais biliares e antagonismo contra patógenos de referência, sendo considerado "positivo" para a tecnologia de alimentos. Por outro lado, isolados de *E. casseliflavus* emergiram como patógenos oportunistas, resultando em bacteremia em humanos, geralmente associada com doença do trato biliar e baixo risco de mortalidade (Choi et al., 2004).

Dez isolados (12,8%) foram confirmados pelo sequenciamento como *Pediococcus pentosaceus*. Micro-organismos desse gênero podem ser isolados a partir de

várias fontes como o solo, plantas, embutidos, picles, vinhos e queijos (Gurira & Buys, 2005; Todorov & Dicks, 2005; Di Cagno et al., 2009; Huang et al., 2009; Nieto-Lozano et al., 2009; Patel & Goyal, 2010). Possuem grande importância econômica na indústria de alimentos fermentados e como culturas *starter* em processos de fermentação de leite, carne, produtos vegetais e embutidos (Nassu et al., 2002; Giraffa, 2007; Shukla & Goyal, 2014).

O potencial tecnológico desse micro-organismo foi descrito por Semjonovs & Zikmanis (2008), demonstrando que esta BAL pode ser utilizada como uma cultura *starter*, para conferir mais atributos funcionais para alimentos fermentados. Shukla & Goyal (2014) descreveram o potencial probiótico de *P. pentasaceus*, a partir da resistência contra lisozima, suco gástrico, sais biliares, hifrofobicidade, autoagregação e atividade antibacteriana, sendo uma BAL com papel potencial para aplicações em alimentos funcionais. *P. pentasaceus*, também é considerado um patógeno oportunista, e tem sido implicado em raros casos de bacteremia em pacientes imunocomprometidos (Barros et al., 2001; Ludlow & Pasikhova, 2013).

*Streptococcus salivarius* foi confirmado em apenas duas amostras (2,6%) e, bactérias deste gênero são muito utilizadas como inóculos na elaboração de produtos lácteos fermentados (Aquarone, 2001). O papel protetor de *S. salivarius* na inibição dos principais patógenos que podem acometer a orofaringe foi sugerido por Júnior & Pignatari (2014).

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* são utilizados na fermentação do iogurte e descritos por acompanhar, de forma complementar, outras bactérias lácticas, contribuindo para a determinação das características do produto final (Brasil, 1998) e preservar o balanço entre a acidez, sabor e aroma (Davis, 1970).

Na tabela 4 estão contidos os resultados das frequências de inibição de BAL isoladas de leite ovino, com atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus sakei*.

A partir da formação de halos de inibição, verificou-se que: 37 isolados (47,4%) apresentaram ação antagonista contra *S. aureus* ATCC 25923; 33 (42,3%) para *S. aureus* ATCC 12598; nove (11,5%) para *S. aureus* ATCC 12600; oito (10,3%) para *S. aureus* 26BP6; 23 (29,5%) contra *L. monocytogenes* ATCC 7644; 18 (23,1%) para *L. monocytogenes* 537; nove (11,5%) para *L. monocytogenes* ATCC 49594; nove (11,5%) para *L. monocytogenes* ATCC 15313 e 71 (91%) produziram halo de inibição para *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 (Tabela 4), sendo verificado que um mesmo isolado manifestou antagonismo frente mais de um micro-organismo indicador. *Lb. sakei* ATCC 15521 conhecido como sensível as substâncias produzidas por BAL foi o gênero que apresentou maior sensibilidade como era esperado, seguido por *Staphylococcus* spp. (Tabela 4).

Tabela 4. Frequências de inibição dos diferentes gêneros de BAL isoladas de leite ovino com atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus sakei*.

Micro-organismo alvo	<i>Lc. lactis</i> (n=33) n (%)	<i>Lc. garvieae</i> (n=1) n (%)	<i>E. faecium</i> (n=16) n (%)	<i>E. faecalis</i> (n=14) n (%)	<i>E. casseliflavus</i> (n=2) n (%)	<i>P. pentasaceus</i> (n=10) n (%)	<i>S. salivarius</i> (n=2) n (%)	Frequência de inibição n (%)
<i>Lb. sakei</i> ATCC 15521	30 (38,5)	0	15 (19,2)	12 (15,4)	2 (2,6)	10 (12,8)	2 (2,6)	71 (91,0)
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	3 (3,8)	0	4 (5,1)	0	0	2 (2,6)	0	9 (11,5)
<i>S. aureus</i> ATCC 12598	20 (25,6)	0	5 (6,4)	4 (5,1)	0	4 (5,1)	0	33 (42,3)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	14 (17,9)	1 (1,3)	12 (15,4)	5 (6,4)	2 (2,6)	2 (2,6)	1 (1,3)	37 (47,4)
<i>S. aureus</i> 26BP6*	3 (3,8)	0	4 (5,1)	0	0	1 (1,3)	0	8 (10,3)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	5 (6,4)	1 (1,3)	8 (10,3)	2 (2,6)	0	7 (9,0)	0	23 (29,5)
<i>L. monocytogenes</i> Scott A ATCC 49594	6 (7,7)	0	1 (1,3)	2 (2,6)	0	0	0	9 (11,5)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	4 (5,1)	0	1 (1,3)	3 (3,8)	0	1 (1,3)	0	9 (11,5)
<i>L. monocytogenes</i> 537**	4 (5,1)	0	9 (11,5)	0	2 (2,6)	3 (3,8)	0	18 (23,1)

\**S. aureus* 26BP6 – isolado de queijo

\*\**L. monocytogenes* 537 – isolado de carcaça bovina

Meira et al. (2012) verificaram a inibição dos patógenos *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* e *S. typhimurium* quando utilizadas culturas de BAL isoladas de leite e queijo de ovelha. Essas observações indicam interessante perspectiva tecnológica de utilização de culturas de BAL para o controle de patógenos em produtos lácteos.

Observou-se que 71 isolados (91,0%) de BAL testados apresentaram antagonismo frente à *Lb. sakei* ATCC 15521, e três (3/33) isolados de *Lactococcus lactis* não apresentaram ação antagonista contra essa bactéria. Para Guedes Neto et al. (2005), embora ocorra antagonismo entre BAL, estas podem ser utilizadas com a finalidade de melhorar a qualidade sanitária do produto. Costa et al. (2013) pesquisando o antagonismo de BAL isoladas de queijo-de-minas artesanal apresentaram médias de halos de inibição maiores frente a patógenos em comparação às BAL isoladas dos mesmos queijos, demonstrando baixa atividade inibitória contra outras bactérias lácticas e possibilitando sua utilização e ampliação da ação inibitória contra outros micro-organismos.

Para o grupo de *Lactococcus lactis*, 25,6% (20) dos isolados apresentaram halos de inibição para *S. aureus* ATCC 12598 e 17,9% (14) para *S. aureus* ATCC 25923. Verificou-se que *L. lactis* apresentou maior capacidade de inibição contra *S. aureus* comparado à *L.*

*monocytogenes*. A inibição de *L. monocytogenes* por bactérias do gênero *Lactococcus* em leite bovino também já foi descrita por Nero (2005). Perin (2011) descreveu melhor desempenho da atividade antimicrobiana de *Lactococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. isolados a partir de leite cru e queijos, contra cepas de *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. e outras BAL, quando comparados a *Enterococcus* spp.

Entre os isolados do gênero Enterococos, *E. faecium* apresentou maior frequência de inibição: 12 (15,4%) contra *S. aureus* ATCC 25923, oito (10,3%) contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 e nove (11,5%) contra *L. monocytogenes* 537 isolado de carcaça bovina. Acurcio et al. (2014) avaliaram os halos de inibição de *Enterococcus* spp. isolado de leite de ovelha e observaram que a inibição frente a *E. coli* e *L. monocytogenes* foram superiores à inibição sobre os demais micro-organismos (*E. faecalis*, *S. aureus*, *S. enterica* var. Typhimurium e *E. durans* isolados do próprio leite de ovelha utilizado no estudo), indicando a maior capacidade desses enterococos em inibir *in vitro* esses dois patógenos.

Nove (11,5%) BAL isoladas apresentaram antagonismo contra cepa de referência *L. monocytogenes* ATCC 49594 conhecida como “Scott A”, enquanto Guerra & Bernardo (2001), em Portugal, em ensaios de inibição contra esse patógeno relataram que 39,2% (208/531) da microbiota de maturação natural de queijos alentejanos apresentaram efeitos antagônicos diretos com este micro-organismo.

Para os isolados da espécie *P. pentosaceus* a frequência foi de 5,1% (4) para *S. aureus* ATCC 12598 e 9,0% (7) contra *L. monocytogenes* ATCC 7644. A atividade antibacteriana também foi relatada por Shukla & Goyal (2014) contra *E. coli* e *S. aureus*, indicando que esta BAL possui potencial para aplicações em alimentos funcionais.

*Streptococcus salivarius* não apresentou inibição frente aos patógenos pesquisados, com exceção de sensibilidade contra a cepa *S. aureus* ATCC 25923. No entanto, Wescombe et al. (2006) descreveram seu potencial de uso como probiótico, prevenindo a colonização e infecção da cavidade oral por *Strep. pyogenes*, causador de infecções de garganta, e pela produção de lantibiótico chamado salivaricina produzida por esta BAL.

Culturas de BAL autóctones com capacidade de produzir substâncias antagonistas foram identificadas por meio da técnica utilizada, demonstrando o potencial antagonista, principalmente contra *Lb. sakei* ATCC 15521, seguido de *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 12598 e *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 537.

As BAL que se apresentaram positivas no teste de antagonismo foram submetidas ao teste bacteriocinogênico para determinar a natureza das substâncias produzidas pelas culturas, porém essa atividade bacteriocinogênica não foi confirmada. Verificou-se que não



houve atividade inibitória em nenhuma das cepas de referência e isolados de campo utilizados nas análises, indicando a produção de outras substâncias antimicrobianas que não são bacteriocinas, por esses isolados.

Em outros estudos com ação microbiana de BAL, Guerra & Bernardo (2001) também não constataram a produção de bacteriocinas e, segundo os autores, a inibição de *L. monocytogenes* “Scott A” foi atribuída à produção de ácidos orgânicos e de peróxido de hidrogênio. Assim, esse resultado indica que a atividade antimicrobiana ocorreu devido ao contato célula a célula, de BAL e micro-organismo indicador; à produção de substâncias inibidoras difundidas no ágar, como ácidos orgânicos ou dióxido de carbono (Naidu et al., 1999), o que não foi alvo de estudo da pesquisa.

Furtado (2010) trabalhando com leite de cabra cru, constatou que de 60 colônias de BAL capazes de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes*, seis cepas foram produtoras de bacteriocinas, confirmadas pelo teste de enzimas proteolíticas, e identificadas pelo sequenciamento do 16S rRNA como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc lactis* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

Produtos lácteos fabricados artesanalmente com leite cru de origem ovina sem adição de culturas iniciadoras são caracterizados pelo aroma e sabores típicos, o que implica a presença de uma microbiota autóctone, altamente variável na composição e responsável pelas atividades metabólicas (Medina et al., 2011). Deste modo, mesmo não sendo identificada a produção de bacteriocinas em nosso estudo, a diversidade de bactérias lácticas e o perfil de inibição apresentado pelos isolados aos micro-organismos testados, confirma a importância de BAL na atividade antimicrobiana, assim o leite de ovelhas criadas na região precisa ser melhor investigado quanto ao seu potencial tecnológico.

#### 4 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram alta frequência de bactérias ácido lácticas nas amostras analisadas e uma microbiota diversificada composta por micro-organismos de interesse para a indústria laticinista como *Lactococcus lactis* e *Streptococcus salivarius*, assim como outros que, atualmente, são focos de diversas pesquisas como *Pediococcus pentasaceus* e *Enterococcus* spp. As culturas de BAL isoladas, apesar de não serem bacteriocinogênicas, apresentaram reação de antagonismo contra os micro-organismos patogênicos testados *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, sugerindo a atividade antagonista relacionada à produção de outras substâncias.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM™ - Guia de interpretação petrifilm AC para cultivo de bactérias ácido lácticas, USA, 2006. Disponível em: <[http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt\\_BR/Microbiology/FoodSafety/](http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/)>. Acesso em: 14 set. 2012.

ACURCIO, L.B. **Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido-láticas isoladas de leite de ovelha.** 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

ACURCIO, L.B.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; OLIVEIRA, D.L.S.; SANDES, S.H.C.; ALVIM, L.B. Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 66, n.3, p. 940-948, 2014.

AQUARONE, E. **Biotecnologia agroindustrial: biotecnologia na produção de alimentos.** São Paulo: Edgard Blucher, v.4, 2001.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects.** 3ª ed. Marcel Dekker, In. New York. p. 1-66. 2004.

AZIZ, T.; KHAN, H.; BAKHTAIR, S.M.; NAURIN, M. Incidence and relative abundance of lactic acid bacteria in raw milk of buffalo, cow and sheep. **The Journal of Animal & Plant Sciences.** v. 19, n.4, p. 168-173, 2009.

BARROS, R.R.; CARVALHO, M.G.S.; PERALTA, J.M.; FACKLAM, R.R.; TEIXEIRA, L.M. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pediococcus* Strains Isolated from Human Clinical Sources. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 39, n. 4, p. 1241-1246, 2001.

BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; CAVALETTI, L.; OVÍDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science,** v.76, p.591-596, 2007.

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

BRASIL. Leis, decretos, etc. **Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos especiais, diet e enriquecidos**. São Paulo, 1998, 212p.

BROMBERG, R., MORENO, I., DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Food Science and Technology**. v. 26, p. 135-144, 2006.

CELIA, A.P.; MORAES, J.F.D.; SCHMIDT, V. Consumo de produtos lácteos de origem não bovina no Sul do Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 67, n. 357, p. 25-30, 2012.

CHOI, S.H.; LEE, S.O.; KIM, T.H.; CHUNG, J.W.; CHOO, E.J.; KWAK, Y.G.; KIM, M.; WOO, J.H.; RYU, J.; KIM, N.J. Clinical Features and Outcomes of Bacteremia Caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: Analysis of 56 Cases. **Clinical Infectious Diseases**. v.38, n.1, p.53-61, 2004.

COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACÚRCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.F.S.; NUNES, A.C. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.65, n.6, p.1858-1866, 2013

DAL BELLO, B.; RANTSIOU, K.; BELLIO, A.; ZEPPA, G.; AMBROSOLI, R.; CIVERA, T.; COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology**. v. 43, p.1151-1159, 2010.

DAVIS, J.G. Laboratory control of yogurt. **Dairy Industries**. v.35, p.139-144, 1970.

DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; COLIN, H.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**. v. 16, p.1058 - 1071, 2006.

DELAVENNE, E.; MOUNIER, J.; DÉNIEL, F.; BARBIER, G.; LE BLAY, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. **International Journal of Food Microbiology**. v.155, p.185-190, 2012.

DE MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 119-126, 1998.

DI CAGNO, R.; SURICO, R.F.; PARADISO, A.; DE ANGELIS, M.; SALMON, J.C.; BUCHIN, S.; DE GARA, L.; GOBBETTI, M. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. **International Journal of Food Microbiology**. v.128, p.473-483, 2009.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**. v.25, p.392-399, 2008.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association. 2001

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 3-11, 2009.

FURTADO, D.N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo frescal de leite de cabra**. 2010. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2010.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v.205, n. 1, p.31-36, 2001.

GIRAFFA, G. **Enterococci and Dairy Products. Chapter 50. In: Handbook of Food Products Manufacturing**. HUI, Y.H. associate editors. p.85-97. 2007.

GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 245-250, 2005.

GUERRA, M.M.; BERNARDO, F.M.A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.96, p.65-69, 2001.

GURIRA, O.Z.; BUYS, E.M. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farmstyle cheese. **Food Microbiol.** v.22, p.159-168, 2005.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365S-373S, 2001.

HUANG, Y.; LUO, Y.; ZHAI, Z.; ZHANG, H.; YANG, C.; TIAN, H.; LI, Z.; FENG, J.; LIU, H.; HAO, Y. Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. **Food Control**. v. 20, p. 1030-1035, 2009.

JÚNIOR, J.F.N.; PIGNATARI, S.S.N. Prevalência de *Streptococcus salivarius* em flora oral de pacientes com e sem histórico de tonsilites de repetição. 2014. Disponível em:< [http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id\\_materia=3753&fase=imprime](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=3753&fase=imprime)>. Acesso em: 10/10/2014.

KLIJN, N.; WEERKAMP, A.H.; DE VOS, W.M. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 57, p.3390-3393, 1991.

KONDYLI, E.; SVARNAS, C.; SAMELIS, J.; KATSIARI, M.C. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. **Small Ruminant Research**. v. 103, p. 194-199, 2012.

LASAGNO, M.; BEOLETTO, V.; SESMA, F.; RAYA, R.; FONT DE VALDEZ, G.; ERASO, A. Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. **Microbiologia**, v. 25, p. 37-44, 2002.

LUDLOW, S.P.; PASIKHOVA, Y. A Case Report of *Pediococcus pentosaceus* Bacteremia Successfully Treated With Daptomycin. **Infectious Diseases in Clinical Practice**. 2013.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. Methods for Studying Bacteriocins, p. 315-422. In: Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (Eds.), **Methods in Microbiology**. Academic Press, 1972.

MEDINA, R.B.; OLISZEWSKI, R.; ABEIJÓN MUKDSI, M.C.; VAN NIEUWENHOVE, C.P.; GONZÁLEZ, S.N. Sheep and goat's dairy products from South America: Microbiota and its metabolic activity. **Small Ruminant Research**. v. 101, n. 1-3, p. 84– 91, 2011.

MEIRA, S.M.M.; HELFER, V.E.; VELHO, R.V.; MEDINA, L.F.C.; BRANDELLI, A. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. **Brazilian Journal of Food Technology**. III SSA, p.75-80, 2010.

MEIRA, S.M.M.; HELFER, V.E.; VELHO, R.V.; LOPOES, F.C.; BRANDELLI, A. Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. **Journal of Dairy Research**. v. 79, p.119-127. 2012.

MORAES, P.M.; PERIN, L.M.; TASSINARI ORTOLANI, M.B.; YAMAZI, A.K.; VIÇOSA, G.N; NERO, L.A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**. v. 43, p. 1320-1324, 2010.

MORAES, P.M; PERIN, L.M.; SILVA JÚNIOR, A.; NERO, L.A. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 112, p. 109-112, 2013.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 38, p.13-126, 1999.

NASSU, R.T.; GUARALDO GONÇALVES, L.A.G.; BESERRA, F.J. Utilização de diferentes culturas *starter* no processamento de embutido fermentado de carne de caprinos. **Ciência Rural**. v.32, n.6, 2002.

NERO, L.A. **Listeria monocytogenes e Salmonella spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção**. 141p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo. 2005.

NERO, L.A., BELOTI, V., BARROS, M.A.F., ORTOLANI, M.B.T., TAMANINI, R.; FRANCO, B.D.G.M. Comparison of Petrifilm™ aerobic count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**. n. 14, p. 249–257, 2006.

NERO, L.A.; DE MATOS, M.R.; BARROS, M.D.F.; ORTOLANI, M.B.T.; BELOTI, V. FRANCO, B. **Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development**.

**Zoonoses and Public Health.** v.55, p.299-305, 2008a.

NERO, L.A.; RODRIGUES, L.A.; VIÇOSA, G.N.; ORTOLANI, M.B.T. Performance of petrifilm aerobic count plates on enumeration of lactic acid bacteria in fermented milks. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology.** v. 16, p. 132-139. 2008b.

NIETO-LOZANO, J.C.; REGUERA-USEROS, J.I.; PELAEZ-MARTINEZ, M.C.; SACRISTAN-PEREZ-MINAYO, G. et al. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dryfermented sausages and frankfurters. **Food Control.** v21, p.679-685, 2009.

NOVELLO, Z.; PREIS, C. Desenvolvimento e caracterização de queijo minas curado elaborado com leite de ovelha. 2012. Disponível em: < <http://m.farmpoint.com.br/cadeia-produtiva/dicas-de-sucesso/desenvolvimento-e-caracterizacao-de-queijo-minas-curado-elaborado-com-leite-de-ovelha-78637n.aspx>>. Acesso em: 22 abr 2013.

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. 107f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa. 2009.

ORTOLANI, M.B.T.; YAMAZI, A.K.; MORAES, P.M.; VIÇOSA, G.N.; NERO, L.A. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease.** v.7, n.2, p. 175-180, 2010.

PATEL, S.; GOYAL, A. Isolation, characterization and mutagenesis of exopolysaccharide synthesizing new strains of lactic acid bacteria. **International Journal of Microbiology.** v 8, n.1, p.3-4, 2010.

PERIN, L.M. **Caracterização de fatores interferentes na produção de bacteriocinas por bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo.** 2011. 90p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa. 2011.

PFEILER, E.A.; KLAENHAMMER, T.R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology.** v. 15, p. 546-553, 2007.

RODRÍGUEZ, E.; GONZÁLEZ, B.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal.** v.10, p.7-15, 2000.

ROHENKOHL, J.E.; CORRÊA, G.F.; AZAMBUJA, D.F.; PERREIRA, F.R. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Indicadores Econômicos FEE,** Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 97-114, 2011.

SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Chapter 49. Functional Microbes: Technology for Health Foods. In: **Handbook of Food Products Manufacturing.** HUI, Y.H. associate editors p.67-84. 2007.

SALMINEN, S., VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects.** New York: Marcell Dekker. 2004.

SCHIRRU, S.; TODOROV, S.D.; FAVARO, L.; MANGIA, N.P.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; COMUNIAN, R.; FRANCO, B.D.G.D.; DEIANA, P. Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. **Food Control**. v. 25, p. 309-320, 2012.

SEMJONOV, P.; ZIKMANIS, P. Evaluation of novel lactose-positive and exopolysaccharideproducing strain of *Pediococcus pentosaceus* for fermented foods. **European Food Research and Technology**. v. 227, p. 851-856, 2008.

SHUKLA, R.; GOYAL, A. Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* CRAG3: A New Isolate from Fermented Cucumber. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**. v. 6, p. 11-21, 2014.

SOUZA, L.M.J. **Avaliação do sistema petrifilm™ na enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária e patogênicos no leite de origem ovina**. 2013. 36p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, 2013.

TERZIC-VIDOJEVIC, A.; MIHAJLOVIC, S.; UZELAC, G.; VELJOVIC, K.; TOLINACKI, M.; NIKOLIC, M.; TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses, sweet creams and sweet kajmaks over four seasons. **Food Microbiology**. v. 39, p. 27-38, 2014.

TODOROV, S.D. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 178-187, 2008.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 365-370, 2005.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. **Methods in molecular and cellular biology**. v. 5, p. 25-40, 1994.

WESCOMBE, P.A.; BURTON, J.P.; CADIEUX, P.A.; KLESSE, N.A.; HYINK, O.; HENG, N.C.K.; CHILCOTT, C.N.; REID, G.; TAGG, J.R. Megaplasms encode differing combinations of lantibiotics in *Streptococcus salivarius*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.90, p.269-280, 2006.

WIDYASTUTI, Y.; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, A. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 435-442, 2014.



## **CAPÍTULO 4**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que o leite de ovelhas criadas na região do Distrito Federal, apresenta características físico-químicas e, qualidade e segurança microbiológica que conferem ao produto condições para o seu aproveitamento tecnológico na produção de queijos e outros derivados. As amostras analisadas apresentaram baixas contagens de micro-organismos indicadores de qualidade higiênico sanitária como aeróbios mesófilos, coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além de ausência dos patógenos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Essa qualidade garante a manutenção das propriedades nutricionais do leite de ovelha e pode representar uma excelente oportunidade de fonte de renda para os produtores da região já que os derivados, em especial os queijos, alcançam valores bem maiores no mercado em relação aos elaborados com leite de vaca e no DF existe uma demanda crescente por queijos especiais com sabores diferenciados.

Na caracterização da microbiota láctica autóctone comprovou-se alta frequência e diversidade que apresentou ampla atividade antagonista frente a micro-organismos patogênicos apesar de não produzir bacteriocinas.

Considera-se importante ressaltar que o leite de origem ovina da região do Distrito Federal, mesmo quando não proveniente de raças especializados, apresenta potencial tecnológico a ser explorado comercialmente, principalmente na produção de queijos e fermentados e são necessários mais estudos a fim de investigar, mais detalhadamente, a microbiota láctica, em especial quanto ao potencial probiótico desses isolados.

**ANEXOS**

Tabela 1. Resultados obtidos nas análises para determinação do perfil físico-químico de leite ovino de rebanhos do Distrito Federal.

<b>Amostra</b>	<b>Gordura</b>	<b>SNG</b>	<b>Densidade</b>	<b>Proteína</b>	<b>Lactose</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez</b>	<b>Crioscopia</b>
1	5,74	11,8	1,041	5,70	5,15	6,75	16	586
2	3,22	8,22	1,029	2,68	4,91	6,66	22	584
3	6,89	11,7	1,039	5,63	5,13	6,73	28	571
4	7,78	11,9	1,039	5,80	5,12	6,70	24	581
5	5,05	11,8	1,042	5,68	5,17	6,87	20	569
6	4,58	11,4	1,040	5,32	5,14	6,73	20	570
7	7,74	9,41	1,029	3,76	4,91	6,62	28	591
8	3,83	11,2	1,042	5,12	5,19	6,94	20	560
9	1,92	11,0	1,042	4,93	5,18	6,98	20	565
10	3,21	12,2	1,047	5,96	5,26	7,05	18	580
11	3,61	13,2	1,049	6,83	5,29	7,03	22	574
12	4,00	11,5	1,048	5,44	5,17	7,03	22	562
13	13,7	13,5	1,041	7,24	5,11	8,15	14	560
14	4,16	12,2	1,045	6,05	5,21	7,86	28	577
15	1,38	11,4	1,043	5,25	5,21	7,26	22	574
16	3,01	9,26	1,035	3,49	5,06	7,83	16	578
17	10,3	10,7	1,032	4,86	4,96	7,42	18	568
18	7,44	9,18	1,029	3,56	4,90	7,35	16	561
19	3,98	12,1	1,043	5,82	5,30	7,35	20	568
20	2,99	11,21	1,041	5,24	5,10	6,50	22	572
21	3,02	10,6	1,040	4,00	5,84	7,28	20	586
22	3,22	12,1	1,044	5,89	5,22	7,41	22	569
23	3,43	11,2	1,040	5,17	5,16	7,42	22	562
24	3,60	11,2	1,040	5,12	5,15	7,26	16	566
25	4,10	12,0	1,043	5,83	5,19	7,22	24	576
26	3,60	13,0	1,048	6,65	5,28	7,45	22	568
27	2,82	12,0	1,044	5,84	5,22	7,39	24	575
28	3,41	12,0	1,045	6,07	5,23	7,06	22	569
29	6,11	12,0	1,041	5,84	5,15	7,30	20	575
30	3,97	11,9	1,043	5,77	5,20	7,35	20	568
31	5,59	11,8	1,041	5,66	5,15	6,96	24	565
32	7,11	9,38	1,030	3,72	4,92	7,13	22	550
33	5,59	11,8	1,041	5,66	5,15	6,96	24	565
34	8,07	11,9	1,039	5,83	5,11	7,09	24	565
35	8,30	11,2	1,036	5,22	5,05	7,11	22	582
36	5,88	11,0	1,037	5,01	5,08	7,09	20	552
37	5,75	11,8	1,041	5,84	5,16	6,72	16	585
38	5,17	11,0	1,038	5,06	5,11	7,27	24	541
39	1,47	10,3	1,039	4,33	5,13	6,83	22	587
40	1,21	11,5	1,044	5,39	5,22	7,00	20	575
41	2,71	11,9	1,044	5,74	5,22	7,05	24	556

Tabela 1. Continuação.

42	3,09	12,9	1,048	6,60	5,27	3,42	20	556
43	2,02	11,5	1,043	5,40	5,21	6,76	14	585
44	1,92	11,8	1,045	5,65	5,23	6,91	20	568
45	2,85	11,7	1,043	5,54	5,21	6,74	24	570
46	2,83	11,7	1,043	5,24	5,20	6,67	22	572
47	3,38	11,9	1,044	5,75	5,20	6,90	22	564
48	1,56	12,3	1,047	6,07	5,27	6,78	28	571
49	2,29	12,4	1,047	6,13	5,26	6,80	26	568
50	2,64	12,0	1,045	5,81	5,23	7,05	18	549
51	2,99	12,6	1,047	6,30	5,26	7,04	24	570
52	2,89	11,8	1,044	5,65	5,20	6,92	18	574
53	1,62	12,2	1,047	5,98	5,26	7,97	22	575
54	2,35	11,3	1,042	5,22	5,18	6,82	22	572
55	7,13	9,78	1,032	3,83	5,18	8,70	20	570
56	7,95	8,71	1,027	2,97	5,06	8,90	15	566
57	3,53	11,9	1,044	5,53	5,43	6,27	18	561
58	8,79	11,5	1,037	5,31	5,29	6,12	20	560
59	9,19	11,2	1,036	5,04	5,25	7,57	12	577
60	12,9	11,4	1,033	5,33	5,18	2,04	22	ND
61	6,55	11,8	1,040	5,47	5,36	5,68	14	562
62	13,8	10,2	1,028	4,33	5,05	6,67	20	ND
63	6,92	9,74	1,032	3,79	5,48	8,66	10	591
64	3,20	12,6	1,047	6,10	5,48	7,03	18	562
65	8,58	8,6	1,026	2,90	5,03	7,24	16	ND
66	7,31	10,1	1,032	3,91	5,29	8,40	20	ND
67	5,25	11,5	1,040	5,25	5,36	8,40	22	539
68	5,37	11,0	1,038	4,77	5,32	5,65	22	572
69	7,08	12,6	1,043	6,18	5,40	7,67	24	570
70	7,46	12,5	1,042	6,09	5,38	6,06	20	569
71	7,04	11,4	1,039	5,41	5,34	7,90	22	565
72	3,18	11,3	1,041	5,04	5,39	5,04	22	576
73	8,81	10,8	1,034	4,75	5,23	6,64	20	584
74	5,24	11,4	1,040	5,26	5,35	7,40	22	538
75	6,45	11,7	1,040	5,45	5,35	11,70	26	568
76	4,21	10,7	1,038	4,53	5,32	6,10	22	572
77	5,22	11,8	1,042	5,44	5,38	9,12	22	575
78	3,41	8,77	1,031	2,92	5,17	12,8	18	ND
79	3,83	9,10	1,032	3,20	5,19	8,11	16	522
80	3,28	9,47	1,034	3,49	5,24	5,51	16	548
81	3,60	9,84	1,035	3,80	5,27	5,00	18	548
82	6,73	9,67	1,031	3,73	5,18	4,81	20	556
83	4,01	10,3	1,037	4,23	5,30	5,24	20	560
84	3,57	9,60	1,034	3,60	5,25	5,19	20	532
85	3,71	9,43	1,033	3,47	5,23	5,53	18	ND

Tabela 1. Continuação.

86	4,32	10,5	1,037	4,39	5,31	5,11	32	562
87	4,43	10,3	1,036	4,20	5,29	5,36	22	563
88	6,46	12,3	1,042	5,91	5,39	5,62	22	575
89	6,52	10,8	1,036	3,40	5,32	5,18	24	555
90	8,68	12,6	1,042	6,19	5,37	5,18	24	577
91	6,95	12,0	1,041	5,67	5,37	5,06	22	571
92	7,77	11,7	1,039	5,44	5,32	6,16	20	571
93	4,77	11,0	1,038	4,77	5,33	2,87	18	552
94	7,35	11,2	1,037	4,99	5,29	3,95	22	567
95	6,36	11,7	1,040	5,37	5,35	5,35	22	575
96	4,57	11,2	1,039	4,92	5,35	4,09	20	563
97	6,53	11,6	1,040	5,34	5,34	7,67	22	561
98	6,93	13,0	1,045	6,53	5,44	3,73	26	567
99	1,78	11,8	1,045	4,41	6,47	8,04	24	ND
100	9,86	10,6	1,032	4,56	5,19	6,6	24	574
101	10,1	12,0	1,038	5,77	5,30	6,62	26	ND
102	9,92	12,0	1,038	5,76	5,30	6,65	26	ND
103	7,03	12,1	1,041	5,78	5,38	6,71	24	599
104	3,76	9,87	1,035	3,83	5,27	6,6	26	573
105	7,93	8,90	1,027	3,13	5,07	6,9	20	568
106	8,42	11,00	1,035	4,86	5,26	2,53	26	565
107	5,31	10,6	1,037	4,50	5,29	6,88	22	562
108	6,89	10,8	1,036	4,67	5,28	6,94	24	545
109	4,49	10,1	1,035	5,53	5,27	6,98	22	578
110	4,94	10,2	1,035	4,14	5,27	6,82	22	560
111	4,67	9,37	1,032	3,44	5,20	7,15	20	576
112	4,75	10,7	1,037	4,56	5,32	7,12	20	590
113	4,89	10,9	1,038	4,72	5,32	7,07	20	599
114	4,09	11,0	1,039	4,75	5,35	6,97	20	599
115	4,13	9,22	1,032	3,30	5,20	7,11	16	529
116	4,42	9,24	1,032	3,33	5,19	7,15	18	525
117	7,08	12,36	1,043	6,19	5,30	7,67	24	570
118	4,92	10,06	1,035	4,21	5,22	6,72	21	ND
119	3,81	9,02	1,033	3,73	5,29	5,13	18	ND
120	8,68	12,64	1,042	6,07	5,86	5,18	24	575
121	6,95	12,17	1,041	5,98	5,21	5,06	22	571
122	7,77	11,9	1,039	5,66	5,36	6,16	20	571
123	8,10	12,29	1,038	5,74	5,40	6,61	26	571
124	7,10	12,19	1,043	6,20	5,10	7,67	24	570
125	6,37	11,34	1,070	5,27	5,35	5,31	22	575
126	6,90	10,02	1,036	3,60	5,48	5,78	24	555

Tabela 2. Contagens de *Staphylococcus aureus*, aeróbios mesófilos, coliformes totais, *Escherichia coli* e Bactérias Ácido Láticas (BAL) em amostras de leite cru ovino coletadas de rebanhos do Distrito Federal.

Amostra	UFC/mL				
	<i>S. aureus</i>	Aeróbios mesófilos	Coliformes totais	<i>Escherichia coli</i>	BAL
1	0	260	0	0	ND
2	0	320	0	0	140
3	0	8	0	0	0
4	0	14	0	0	0
5	61	900	0	0	300
6	188	1800	0	0	17
7	0	910	0	0	26
8	0	35	0	0	0
9	21	3000	0	0	440
10	0	124	0	0	0
11	3	124	0	0	50
12	7	27	0	0	0
13	5	4100	0	0	1700
14	32	120	0	0	0
15	0	1	0	0	0
16	0	13	0	0	0
17	50	450	0	0	0
18	24	1380	0	0	1230
19	17	90	0	0	710
20	55	120	0	0	80
21	2	1170	1	0	1060
22	3	124	9	3	70
23	0	151	0	0	67
24	0	110	0	0	87
25	0	36	0	0	13
26	0	150	0	0	50
27	1	3380	0	0	230
28	52	141	1	1	110
29	4	290	130	13	147
30	0	83	4	1	109
31	3	570	0	0	230
32	0	24	0	0	0
33	0	6	0	0	18
34	0	29	0	0	0
35	2	56	0	0	0
36	0	2640	0	0	550
37	4	53	0	0	0
38	0	5	1	0	0
39	15	2850	0	0	650
40	0	1240	0	0	340

Tabela 2. Continuação.

41	8	2060000	0	0	3410
42	2	1300	0	0	130
43	0	740	5	1	110
44	27	6000	1	0	3200
45	0	680	5	1	140
46	0	5000	5	1	1170
47	0	110000	0	0	1220
48	0	49	0	0	20
49	0	550	0	0	180
50	0	240	0	0	31
51	36	2850	0	0	70
52	0	950	4	0	70
53	38	2230	1	0	0
54	16	30	0	0	0
55	0	4100	140	2	20
56	15	2400	0	0	400
57	15	140	0	0	80
58	ND	12300	0	0	190
59	1	30	3	0	200
60	0	40	0	0	0
61	ND	6900	1	0	40
62	0	23	3	0	0
63	1	620	4	1	80
64	19	13000	3	3	550
65	19	6400	10	10	360
66	0	60	0	0	220
67	0	1400	0	0	2
68	0	610	0	0	0
69	4	900	0	0	1
70	0	60	0	0	9
71	2	200	5	0	0
72	1	400	0	0	10
73	0	300	0	0	3
74	0	500	0	0	9
75	0	1400	0	0	6
76	0	9600	54	0	267
77	27	2630	1	0	369
78	ND	24	54	0	274
79	0	11000	0	0	9000
80	0	12000	2	0	70
81	0	80	0	0	25300
82	420	70000	1400	0	3
83	1	10	0	0	29000
84	76	710000	2370	0	48



Tabela 2. Continuação.

85	2	240	0	0	78000
86	0	210	0	0	16
87	5	110	0	0	3
88	ND	110	0	0	13
89	0	630	0	0	8400
90	0	890	0	0	250
91	48	80	2	0	25
92	4	140	0	0	69
93	0	230	0	0	46
94	0	40	0	0	0
95	21	170	4	0	0
96	0	190	0	0	0
97	0	50	0	0	0
98	0	460	1	0	2
99	0	460	0	0	14
100	0	4300	0	0	102
101	0	40	0	0	96
102	0	330	3	0	21
103	0	100	0	0	6
104	0	510	90	0	1
105	0	10	0	0	134
106	0	280	2	0	6
107	0	500	50	0	14
108	0	10000	0	0	10000
109	0	1160	27	0	0
110	0	250000	0	0	17000
111	0	350	3	0	26
112	0	650	68	0	61
113	0	750	18	0	230
114	0	78	0	0	21
115	0	140	0	0	1600
116	0	13	1	0	10
117	0	730000	0	0	32400
118	0	38000	0	0	15000
119	ND	54000	0	0	14000
120	ND	13000	0	0	5
121	0	2500000	6700	1800	300
122	0	32	0	0	18
123	2	770	0	0	510
124	27	150	0	0	46
125	3	260000	0	0	10000
126	0	120000	3400	0	1500

Tabela 3. Diâmetros dos halos de inibição (mm) verificados no teste de antagonismo das culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de leite ovino contra *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Amostra	BAL identificada	MICRO-ORGANISMOS INDICADORES TESTADOS										Morfologia	Catalase
		<i>L. sakei</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L.</i>	<i>L.</i>	<i>L.</i>	<i>L.</i>			
		ATCC 15521	ATCC 12600	ATCC 12598	ATCC 25923	26BP6*	<i>monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>monocytogenes</i> ATCC 49594	<i>monocytogenes</i> ATCC 15313	<i>monocytogenes</i> 537**			
1	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	8	6	2	0	0	8	0	0	8	Coco Gram+	negativa	
2	<i>Enterococcus faecium</i>	4	0	4	0	4	6	4	0	4	Coco Gram+	negativa	
3	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	4	4	0	0	0	6	0	0	14	Coco Gram+	negativa	
4	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	12	0	0	0	0	4	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
5	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	6	0	2	0	0	4	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
7	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	6	0	2	0	0	4	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
8	<i>Enterococcus faecium</i>	8	0	0	4	0	6	0	4	2	Coco Gram+	negativa	
9	<i>Enterococcus faecium</i>	4	4	0	0	0	6	0	0	4	Coco Gram+	negativa	
11	<i>Enterococcus faecium</i>	8	0	0	6	4	4	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
12	<i>Enterococcus faecium</i>	8	0	0	2	0	6	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
13	<i>Lactococcus lactis</i>	8	0	0	4	0	8	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
14	<i>Enterococcus faecium</i>	4	0	0	6	4	6	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
15	<i>Enterococcus faecium</i>	2	0	0	2	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
16	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	4	0	0	4	0	0	0	0	4	Coco Gram+	negativa	
17	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	6	0	0	4	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
18	<i>Enterococcus faecium</i>	10	0	0	4	0	0	0	0	6	Coco Gram+	negativa	
19	<i>Enterococcus faecium</i>	2	0	0	2	0	0	0	0	6	Coco Gram+	negativa	
20	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	6	0	0	4	4	0	0	0	8	Coco Gram+	negativa	
21	<i>Enterococcus faecium</i>	4	4	6	6	4	2	0	0	6	Coco Gram+	negativa	
22	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	8	0	0	6	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
23	<i>Enterococcus faecium</i>	4	0	0	2	0	0	0	0	6	Coco Gram+	negativa	
24	<i>Lactococcus garvieae</i>	4	0	2	4	0	0	0	0	4	Coco Gram+	negativa	
25	<i>Enterococcus faecium</i>	6	0	0	0	0	2	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
26	<i>Enterococcus faecium</i>	2	0	4	2	0	0	0	0	4	Coco Gram+	negativa	
27	<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	0	2	0	4	0	0	0	Coco Gram+	negativa	
28	<i>Lactococcus lactis</i>	4	4	2	0	0	6	0	2	0	Coco Gram+	negativa	
29	<i>Lactococcus lactis</i>	0	6	0	4	0	6	0	0	4	Coco Gram+	negativa	
30	<i>Lactococcus lactis</i>	6	0	2	4	0	8	0	0	2	Coco Gram+	negativa	
31	<i>Lactococcus lactis</i>	6	0	4	0	0	4	0	0	2	Coco Gram+	negativa	

Tabela 3. Continuação.

32	<i>Lactococcus lactis</i>	6	6	2	8	4	8	2	0	4	Coco Gram+	negativa
33	<i>Lactococcus lactis</i>	14	0	4	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
34	<i>Enterococcus faecalis</i>	12	2	2	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
35	<i>Enterococcus faecalis</i>	10	0	4	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
36	<i>Enterococcus faecalis</i>	10	0	4	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
37	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	0	0	4	2	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
38	<i>Lactococcus lactis</i>	10	0	4	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
39	<i>Lactococcus lactis</i>	8	0	0	4	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
40	<i>Enterococcus faecalis</i>	6	0	0	0	0	0	2	2	0	Coco Gram+	negativa
41	<i>Lactococcus lactis</i>	6	0	2	6	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
42	<i>Lactococcus lactis</i>	8	0	2	0	0	0	0	2	0	Coco Gram+	negativa
43	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	8	0	2	0	0	0	2	6	0	Coco Gram+	negativa
44	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	0	2	6	0	0	8	0	0	Coco Gram+	negativa
45	<i>Lactococcus lactis</i>	10	0	0	6	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
46	<i>Enterococcus faecalis</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
48	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	0	2	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
49	<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
50	<i>Lactococcus lactis</i>	10	0	2	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
51	<i>Lactococcus lactis</i>	10	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
52	<i>Enterococcus faecalis</i>	12	0	0	4	0	0	0	2	0	Coco Gram+	negativa
53	<i>Lactococcus lactis</i>	6	0	0	4	0	0	0	4	0	Coco Gram+	negativa
54	<i>Enterococcus faecalis</i>	6	0	4	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
55	<i>Lactococcus lactis</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
56	<i>Lactococcus lactis</i>	6	0	4	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
57	<i>Lactococcus lactis</i>	8	0	4	4	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
58	<i>Lactococcus lactis</i>	10	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
59	<i>Lactococcus lactis</i>	8	2	4	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
60	<i>Lactococcus lactis</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
61	<i>Enterococcus faecalis</i>	14	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
62	<i>Enterococcus faecalis</i>	6	0	4	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
63	<i>Lactococcus lactis</i>	8	0	2	0	0	0	0	0	2	Coco Gram+	negativa
64	<i>Streptococcus salivarius</i>	14	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
65	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	10	0	4	2	0	0	4	0	0	Coco Gram+	negativa
66	<i>Lactococcus lactis</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
67	<i>Enterococcus faecalis</i>	10	0	4	6	0	0	0	4	0	Coco Gram+	negativa
68	<i>Enterococcus faecium</i>	8	0	4	4	0	0	2	0	0	Coco Gram+	negativa

Tabela 3. Continuação.

69	<i>Enterococcus faecalis</i>	12	0	4	2	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
70	<i>Lactococcus lactis</i>	6	0	0	2	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
71	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	0	0	2	0	2	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
72	<i>Enterococcus faecalis</i>	12	0	0	0	0	6	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
73	<i>Lactococcus lactis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
74	<i>Streptococcus salivarius</i>	2	0	0	4	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
75	<i>Streptococcus salivarius</i>	14	0	0	0	2	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
76	<i>Pediococcus pentosaeus</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
77	<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	Coco Gram+	negativa
78	<i>Enterococcus faecalis</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa
79	<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	0	0	0	6	0	4	0	0	Coco Gram+	negativa
80	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	8	0	0	8	0	0	0	Coco Gram+	negativa
81	<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	Coco Gram+	negativa

\**S. aureus* 26BP6 – isolado de queijo

\*\**L. monocytogenes* 537 – isolado de carcaça bovina

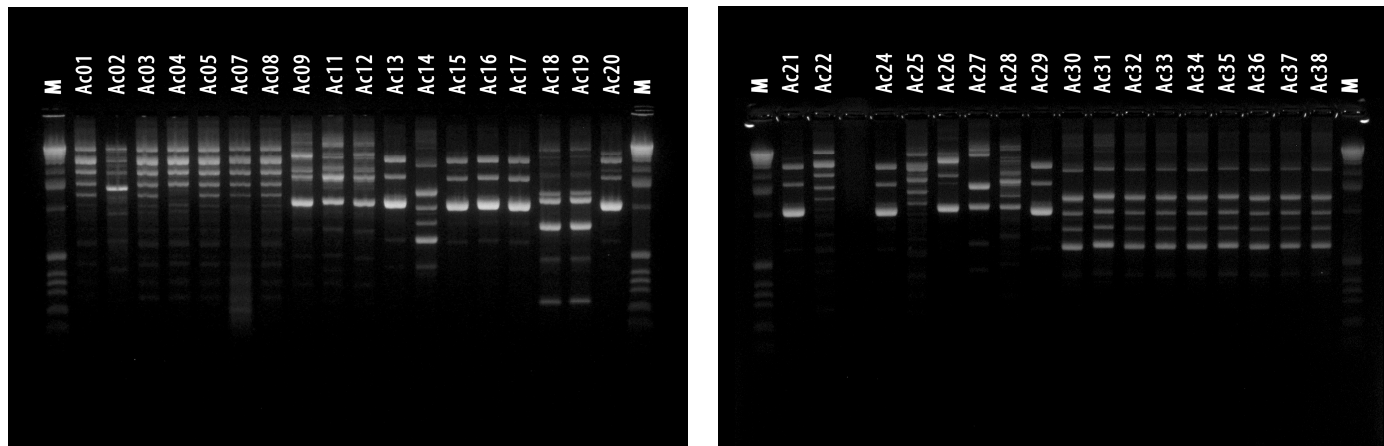


Figura 1. Perfis de reação de Rep-PCR evidenciados em eletroforese em gel de agarose a 2%, das culturas de bactérias ácido lácticas isoladas do leite ovino cru (M: marcador de 1 Kb DNA).

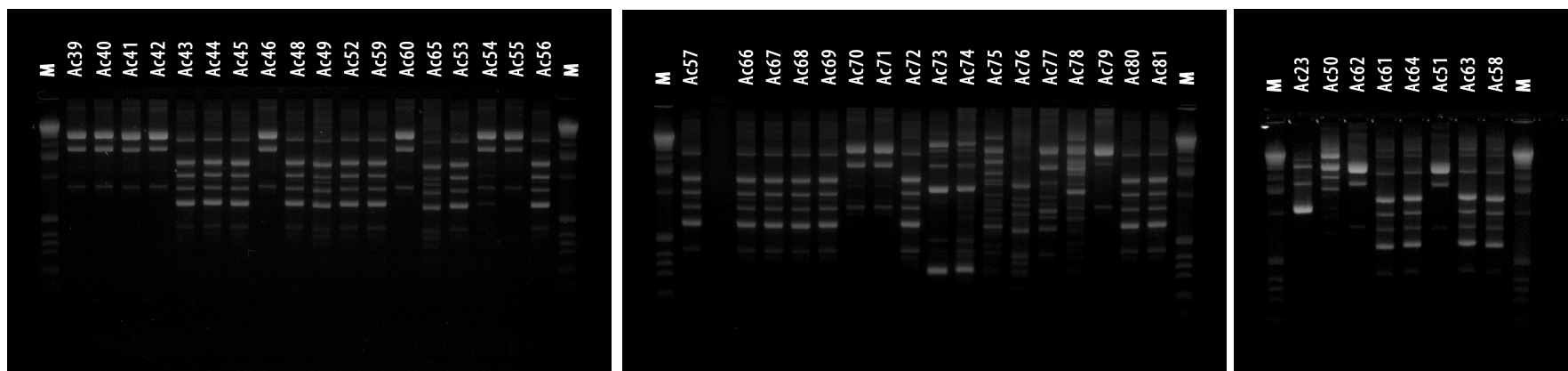


Figura 2. Perfis de reação de Rep-PCR evidenciados em eletroforese em gel de agarose a 2%, das culturas de bactérias ácido lácticas isoladas do leite ovino cru (M: marcador de 1 Kb DNA).