

Leonardo Borges Acurcio

**ISOLAMENTO, ENUMERAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E  
AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE BACTÉRIAS  
ÁCIDO- LÁCTICAS ISOLADAS DE LEITE DE OVELHA**

Dissertação apresentada à  
Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de  
Minas Gerais-UFMG, como  
requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre  
em Ciência Animal.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal  
Orientador: Prof. Marcelo Resende de Souza  
Co-orientador: Prof. Álvaro Cantini Nunes

Belo Horizonte,  
Escola de Veterinária da UFMG  
2011

Dissertação defendida e aprovada em 03 de agosto de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:

---

Prof. Marcelo Resende de Souza  
Presidente

---

Prof<sup>a</sup>. Andréia Marçal da Silva

---

Prof. Jacques Robert Nicoli



## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pois sem o modelo, apoio e carinho deles, nada do que fiz até hoje seria possível. Ao meu pai, principalmente pelo modelo, sendo o pesquisador que é, e à minha mãe pelo carinho, constante e infindável, que nunca me deixa abater.

À minha namorada Paula (Polly), por ter contribuído enormemente para a conclusão desse trabalho, suportando as lamúrias de um mestrando típico.

Ao meu orientador, que me ensinou os caminhos do meio acadêmico e me fez, assim como ele, um apaixonado pela área de tecnologia e inspeção de leite e produtos derivados e pelas bactérias ácido-lácticas probióticas. Por ser um grande amigo, mais de um orientador, e por me apoiar e incentivar nas horas mais difíceis dessa trajetória.

Ao meu co-orientador, Alvaro Cantini Nunes, por possibilitar a minha pesquisa cedendo gentilmente o seu laboratório, além do seu apoio nas horas necessárias.

À banca examinadora, pela disponibilidade, sugestões e críticas.

Aos professores e funcionários do DTIPOA, pela disponibilidade e apoio sempre que necessários. Principalmente à professora Cláudia, que contribui para viabilizar esse projeto e que sempre me ajudou tentando desvendar os “mistérios” do leite de ovelha; aos funcionários Maura e Marco Antônio, por me ensinarem e me ajudarem muito e ao funcionário Evaldo, por dar conta de toda a bagunça produzida pelo meu e tantos outros experimentos do departamento.

Aos amigos do DTIPOA, que tanto colaboraram comigo ou simplesmente por tornarem o ambiente de trabalho e estudo mais agradável: Lorrana Martins, Dimitre Giancarlo, Dalila Oliveira, Naiara Silva, Adriano França, Fátima Resende, Valéria Sampaio, Joana Ferrez, Camila Nair, Fernanda Magalhães, Débora Mendes, Hugo Costa, Camila Andrade, Felipe Chow, Guilherme Marcondes, Maria Carolina, dentre muitos outros.

Aos amigos do LGMPP, do ICB-UFMG, que muito me ensinaram, tanto me ajudaram e me alegraram nas horas difíceis: Sávio Sandes, Luige Alvim, Bruno Campos, Pedro Viana, Adriana Gomes, Lenice Jung e todo o pessoal da Ecovec também.

Aos grandes amigos da Escola de Veterinária da UFMG, por tornarem os horários fora do laboratório descontraídos e me darem força para cada dia de trabalho e pesquisa: Gustavo Moreira, Gabriela Miccoli, Felipe Nemer, Cecília Bonolo, Bruno Amaral, Felipe Albano, Christiane Fernandes, Luigi Cavalcanti, Camila Stephanie, Carla Caires, Ana Paula Franzoni, dentre muitos outros.

Aos mais que especiais amigos “peludos”, por serem uma grande alegria na minha vida: Henrique (Ikona), Flor, Marcos (Magaz), Lucas (Bola), Joana, Paulo (Roney), André (Decão), Fernando (Feijão), Leandro (Lelê), Bruno (Brunão), André (Dudu), Alexandre (Xandão), Thiago (Moleza), Matheus (Bolha), Rogério (Bitoca), entre muitos agregados e agregados de agregados.

Aos demais amigos e familiares como Gabriela (Gabi), Alessandra (Xan), Augusto (Guto), Rodrigo (José), Daniel (Dani), André (Deco), Lucas (Creizy), Ori, Pedro, Geraldo (Gêra), Marcos (Marquim), Augusto (Tio), Vilma (Vivi), Humberto, Valéria, Cristina, Cristina Guedes (Cris), Zé, Carina (Cacá), Álvaro, entre muitos outros.

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO</b>	10
	<b>ABSTRACT</b>	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	13
2.1	Ovinocultura	13
2.1.1	Histórico	13
2.1.2	Ovinocultura no mundo	14
2.1.3	Ovinocultura leiteira	16
2.2	Microbiota do leite de ovelha	20
2.3	Alimentos funcionais	20
2.4.	Alimentos que veiculam microrganismos probióticos	22
2.4.1	Conceito	22
2.4.2	Microrganismos probióticos	23
2.4.2.1	O gênero <i>Bifidobacterium</i>	24
2.4.2.2	O gênero <i>Lactobacillus</i>	24
2.4.2.3	O gênero <i>Weisella</i>	25
2.4.2.4	O gênero <i>Enterococcus</i>	25
2.4.2.5	O gênero <i>Saccharomyces</i>	26
2.4.3	Efeitos benéficos dos microrganismos probióticos	26
2.4.4	Riscos associados aos microrganismos probióticos	29
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
3.1	Aquisição do leite de ovelha e amostragem	30
3.2	Avaliação microbiológica	30
3.2.1	Isolamento, enumeração, caracterização fisiológica e morfo-tintorial de bactérias ácido-lácticas isoladas de leite de ovelha	30
3.2.2	Identificação dos microrganismos isolados de bactérias ácido-lácticas de leite de ovelha por técnicas de biologia molecular	31
3.3	Teste <i>in vitro</i> de sensibilidade ao pH gástrico	35
3.4	Teste <i>in vitro</i> de sensibilidade aos sais biliares	36
3.5	Teste <i>in vitro</i> de susceptibilidade aos antimicrobianos	37
3.6	Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.</b>	40
4.1	Isolamento, enumeração, caracterização fisiológica e morfo-tintorial das bactérias ácido-lácticas isoladas do leite de ovelha	40
4.1.1	Isolamento e enumeração	40
4.1.2	Caracterização fisiológica e morfo-tintorial	41
4.2	Identificação das bactérias ácido-lácticas isoladas do leite de ovelha por técnicas de biologia molecular	41
4.2.1	Identificação pelo método de PCR-ARDRA 16S-23S	41
4.2.2	Identificação por sequenciamento do gene 16S rDNA	42
4.3	Sensibilidade <i>in vitro</i> dos enterococos isolados de leite de ovelha ao pH gástrico	44

4.4	Sensibilidade <i>in vitro</i> dos enterococos isolados de leite de ovelha aos sais biliares	48
4.5	Susceptibilidade <i>in vitro</i> dos enterocococs isolados de leite de ovelha aos antimicrobianos	53
4.6	Anatagonismo <i>in vitro</i> entre os enterococos isolados de leite de ovelha e contra microrganismos indicadores	56
4.7	Seleção dos enterococos com potencial probiótico isolados do leite de ovelha	61
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>62</b>

---

### LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1	Composição (%) do leite de diferentes raças ovinas	19
Tabela 2	Médias da composição (%) do leite de três espécies leiteiras	19
Tabela 3	Espécies de enterococos reveladas pelo sequenciamento do gene 16S rDNA pelo método de Sanger dos microrganismos isolados de leite de ovelha	42
Tabela 4	Absorbância máxima alcançada pelas 16 amostras de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas de leite de ovelha em 15 horas de incubação a 37°C, após três horas de incubação em ácido gástrico (pH 2.0) a 37°C	44
Tabela 5	Percentual de inibição por ácido gástrico (pH 2.0) de 16 amostras de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas de leite de ovelha	45
Tabela 6	Absorbância máxima alcançada pelas 16 amostras de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas de leite de ovelha em 18 horas de incubação a 37°C	48
Tabela 7	Percentual de inibição por sais biliares ( <i>oxgall</i> , BD, 0,3%) de 16 amostras de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas de leite de ovelha	49
Tabela 8	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos (diâmetro do halo de inibição em milímetros) de 16 amostras de <i>Enterococcus</i> spp. isolados de leite de ovelha	53
Tabela 9	Média dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo <i>in vitro</i> dos <i>Enterococcus</i> spp. isolados do leite de ovelha contra microrganismos indicadores	57

Tabela 10	Média (mm) dos halos de inibição dos <i>Enterococcus</i> spp. isolados de leite de ovelha contra cada microrganismo indicador	58
Tabela 11	Média (mm) dos halos de inibição de cada amostra de <i>Enterococcus</i> spp. isolada do leite de ovelha frente aos microrganismos indicadores	60

---

#### LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1	Níveis de susceptibilidade de <i>Enterococcus</i> spp. a antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar MRS ( <i>Difco</i> )	38
----------	--	----

---

#### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	Perfil de restrição enzimática dos isolados de leite de ovelha obtidos por PCR-ARDRA (16S-23S) das amostras 3.1, 5 e 14.3, da esquerda para direita.	41
Figura 2	Curvas de crescimento da amostra 3.1 - <i>Enterococcus faecium</i> - incubada a 37°C em caldo MRS ( <i>Difco</i> ), após incubação em pH 2.0 por três horas e do controle (pH 7.0).	46
Figura 3	Curvas de crescimento da amostra 5 - <i>Enterococcus durans</i> - incubada a 37°C em caldo MRS ( <i>Difco</i> ), após incubação em pH 2.0 por três horas e do controle (pH 7.0).	47
Figura 4	Curvas de crescimento da amostra 14.3 - <i>Enterococcus casseliflavus</i> - incubada a 37°C em caldo MRS ( <i>Difco</i> ), após incubação em pH 2.0 por três horas e do controle (pH 7.0).	47
Figura 5	Curvas de crescimento da amostra 3.1 - <i>Enterococcus faecium</i> - incubada a 37°C em meio contendo <i>oxgall</i> (BD) a 0,3% e do controle.	51
Figura 6	Curvas de crescimento da amostra 5 - <i>Enterococcus durans</i> - incubada a 37°C em meio contendo <i>oxgall</i> (BD) a 0,3% e do controle.	51
Figura 7	Curvas de crescimento da amostra 14.3 - <i>Enterococcus casseliflavus</i> - incubada a 37°C em meio contendo <i>oxgall</i> (BD) a 0,3% e do controle.	52



---

## ANEXOS

---

Anexo 1	Alinhamento das sequências obtidas pelo sequenciamento do gene 16S do rDNA depositadas no <i>GenBank</i> , utilizando o algoritmo BLAST.	73
---------	--	----

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>μ</b>	micro
<b>p/v</b>	peso por volume
<b>v/v</b>	volume por volume
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection (cultura de coleção tipo americano)
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>LDL</b>	Lipoproteína de Baixa Densidade
<b>OD</b>	Optical Density (densidade ótica)
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>USDA</b>	United States Departamento of Agriculture
<b>WHO/OMS</b>	World Health Organization

## RESUMO

O leite de ovelha, obtido de um dos animais domésticos mais antigos do mundo, é diferenciado por seu alto teor de sólidos. Seus produtos derivados, principalmente os queijos, têm maior importância social e econômica que o leite de ovelha em si. As bactérias ácido-lácticas, abundantes no leite de todas as espécies domésticas leiteiras, incluem a maior parte dos microrganismos probióticos, que trazem benefícios ao consumidor quando ingeridos em quantidades adequadas e viáveis. Poucos dados estão disponíveis na literatura sobre a microbiota do leite de ovelha, bem como sobre seu potencial probiótico. Então, o objetivo desse trabalho foi identificar as espécies de bactérias ácido-lácticas no leite de ovelhas das raças Lacaune, Santa Inês e suas mestiças além de avaliar o seu potencial probiótico *in vitro*. A identificação foi realizada por técnicas de biologia molecular como o sequenciamento pelo método de Sanger do 16S rDNA. As espécies identificadas foram *Enterococcus faecium* (56,25%), *E. durans* (31,25%) e *E. casseliflavus* (12,5%). Não foi identificada nenhuma outra espécie de bactéria ácido-láctica. O potencial probiótico foi avaliado pelos testes de tolerância ao pH gástrico, tolerância aos sais biliares, sensibilidade aos antimicrobianos e antagonismo entre amostras isoladas e microrganismos indicadores. Observou-se que 75% dos enterococos testados foram tolerantes ao pH gástrico (2.0) e 56,25% a sais biliares (0,3% de *oxgall*). Todos os enterococos testados foram resistentes a ceftazidima, oxacilina e estreptomicina, assim como foram sensíveis a clindamicina, eritromicina e penicilina. Foram observados variados graus de sensibilidade a ciprofloxacino, a gentamicina, tetraciclina e vancomicina. Todos os enterococos testados inibiram fortemente as amostras de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* testadas, moderadamente as amostras de *E. faecalis* e *Staphylococcus aureus* e não inibiram as amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* var. Typhimurium e uma amostra de *E. durans* isolada do leite de ovelha. Quatro amostras de *E. faecium*, uma amostra de *E. durans* e uma amostra de *E. casseliflavus* apresentaram melhor potencial probiótico, porém, mais estudos são necessários para avaliar se tais amostras apresentam genes para determinados fatores de virulência e para resistência a antimicrobianos e sua provável transmissão a outros microrganismos.

Palavras chave: leite de ovelha, enterococos, potencial probiótico

## ABSTRACT

Sheep milk, obtained from one of the oldest domestic animals, is unique for its high solids ratio. Its cheese are more famous than the milk itself. Lactic acid bacteria, abundant in milk from several mammals, include most of the probiotic microorganisms, which bring benefits to their consumers when ingested in viable and adequate portions. Few data are available in the literature on the microbiota of ewe milk as well on its possible probiotic features. Therefore, the objective of this work was to identify the species of lactic acid bacteria in milks from Lacaune's, Santa Inês and its breed's and evaluate their *in vitro* probiotic potential. The identification was made through Sanger's 16S rDNA sequencing method. The identified species were *Enterococcus faecium* (56.25%), *E. durans* (31.25%) and *E. casseliflavus* (12.5%). Their probiotic potential was evaluated by gastric pH and biliary salt resistance and antimicrobial susceptibility; and antagonism against samples and reference microorganisms. It was observed that 75% of the tested enterococci were resistant to gastric pH (2.0) and 56.25% to 0,3% of oxgall (biliary salts). All the tested enterococci were resistant to ceftazidime, oxacillin, and streptomycin and sensible to clindamycin, erythromycin, and penicillin. The resistance to ciprofloxacin, gentamicin, tetracycline, and vancomycin varied among the tested species. All the tested enterococci strongly inhibited *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* samples, moderately inhibited *E. faecalis* and *Staphylococcus aureus* samples, and didn't inhibit *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* var. Typhimurium samples and also one *E. durans* sample isolated from the evaluated sheep milk. Four samples of *E. faecium*, one of *E. durans*, and one of *E. casseliflavus* presented the best probiotic potential. However, more studies are needed to prove that these samples don't carry neither virulence genes nor antimicrobial resistance genes, as well as their probable transmission to other microorganisms.

Keywords: sheep milk, enterococci, probiotic potential

## 1. INTRODUÇÃO

A ovelha é um dos animais domesticados mais antigos, devido a sua facilidade de criação. Isso, associado ao elevado valor nutritivo do seu leite e excelente rendimento na produção de derivados lácteos, foi tornando a sua criação cada vez mais extensa ao redor do mundo. Pequenas famílias de pastores e tradicionais famílias produtoras de queijos foram valorizando, cada vez mais, os produtos oriundos de leite de ovelha. Dentre esses, destacam-se queijos maturados como: o Roquefort francês, o Pecorino italiano, o Feta grego, o Serra da Estrela português, entre muitos outros (Sá e Sá, 2008).

O leite de ovelha é mais conhecido pelos seus derivados do que pelo produto *in natura* porque possui elevado teor de sólidos associado a um reduzido volume. Isso resulta em ovelha num maior rendimento na produção de derivados lácteos e torna o seu uso quase que compulsório para a produção de queijos e iogurtes. Além disso, esse leite possui uma maior tolerância à deterioração por microrganismos mesófilos devido ao seu maior poder tamponante e à presença de substâncias antimicrobianas naturalmente em maior quantidade (Martins e Mimoso, 2000).

Os alimentos funcionais, em especial os probióticos, têm se apresentado cada vez mais no mercado, principalmente na forma de derivados lácteos, sendo estes representados majoritariamente por leites fermentados, como iogurtes ou bebidas lácteas fermentadas. Outros produtos lácteos contendo microrganismos probióticos, como os queijos, são encontrados com menor frequência, apesar de alguns estudos demonstrarem a sua viabilidade (Badaró *et al.* 2008). No entanto, são escassos os estudos que têm analisado a possibilidade da produção desses queijos a partir de leite de ovelha, bem como sobre sua microbiota (Haenlein, 2005).

Microrganismos probióticos tem sido alvo de vários estudos devido à crescente variabilidade de espécies com potencial probiótico descobertas e testadas. O público-alvo dos alimentos que veiculam microrganismos probióticos, inicialmente formado por idosos, crianças e adultos com saúde debilitada, hoje abrangeu-se a indivíduos

saudáveis de todas as idades e até animais de produção e de companhia (Quigley, 2008).

Portanto, o objetivo do trabalho foi identificar, ao nível molecular, espécies de bactérias ácido-lácticas isoladas do leite de ovelhas das raças Lacaune, Santa Inês e suas mestiças e avaliar o potencial probiótico *in vitro* delas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Ovinocultura**

#### **2.1.1. Histórico**

A domesticação ovina tem seus primeiros registros associados aos povos da Ásia Central, na região da Mesopotâmia, onde habitaram, há muito tempo, pastores hebreus. As citações de criações de ovinos no Antigo Testamento da Bíblia são numerosas e, com isso, é possível supor o quão antiga é a prática. Tão misteriosa quanto a data do princípio da criação ovina é a origem da espécie. Alguns a associam ao Muflon (ou Muflão), uma espécie de ovino selvagem da Eurásia que acredita-se ter sido selecionado desde os primórdios da criação ovina até chegar aos animais de hoje, que diferem muito da suposta espécie de origem (Devendra e Coop, 1982).

A origem das primeiras raças produtoras de lã, como a Merino espanhola, tampouco é bem conhecida. Alguns relatos informam que os ovinos foram domesticados pelos mouros após vencerem a batalha contra os visigodos, que possuíam criações rústicas de ovinos. Outros relatos já apontam para tribos do norte da África, que teriam aprendido sobre a ovinocultura com os fenícios. Outros autores postulam um famoso comerciante da antiga Roma, denominado Columela, como responsável pela origem da ovinocultura na Espanha. Ele teria conseguido os primeiros ovinos de um comerciante de animais exóticos, em uma versão menos verossímil, ou teria trazido os animais já conhecidos na Itália, de uma antiga raça ovina denominada Tarentina. Essa última hipótese é uma das mais aceitas sobre a origem da raça Merino na Espanha. Esta raça foi a responsável pela ascensão da ovinocultura voltada para produção de lã na Europa (Fraser e Stamp, 1989).

Na Inglaterra do século XVIII, a revolução industrial e a produção têxtil que a acompanhou impulsionaram não só a criação de ovinos para produção de lã, como também a economia capitalista, propiciando maior poder de compra aos indivíduos na época. O aumento da criação de ovinos e do poder aquisitivo gerou um aumento no consumo de carnes, especialmente a ovina, por serem abundantes na época. A primeira raça de relevância para a produção de lã foi a Merino, da Espanha, que supriu os rebanhos ingleses, pois sua lã fina imprimia grande qualidade aos produtos têxteis gerados a partir dela. Depois da Inglaterra, foi a vez das colônias do Novo Mundo começarem a criar ovinos para produzir lã para as suas metrópoles e, no final do século XVIII, observou-se a ascensão da produção de lã em países sul americanos, como Uruguai, Argentina e Chile, e países da Oceania, como Nova Zelândia e Austrália. Esses também foram responsáveis por intensificar a produção de carne ovina, a partir da criação da raça Merino Australiana, que tinha maior aptidão para tal e produzia, em compensação, um lanado mais grosso, ideal para outros ramos da indústria têxtil como a tapeçaria. Já nos países mediterrâneos, a domesticação ovina foi bem menos expressiva e muito mais voltada para a subsistência de pequenos agricultores de países como Grécia e Itália, onde a cultura estimula o aproveitamento de tudo que um ovino pode oferecer: carne, leite e lã; não fazendo a seleção para uma única característica (Ross, 1989).

### **2.1.2. Ovinocultura no mundo**

De acordo com dados estimados pela FAO (2005), as maiores densidades populacionais de pequenos ruminantes (caprinos e ovinos) são encontradas nos seguintes países da Europa: Bulgária, Grã-Bretanha, Grécia, Itália, Países Baixos, Polônia, Portugal, Romênia, Sérvia e Ucrânia; Ásia: Afeganistão, Bangladesh, Butão, China, Índia, Indonésia, Irã, Iraque, Israel, Mongólia, Nepal, Palestina, Paquistão, Síria e Turquia; África: Argélia, Burquina-Fasso, Costa do Marfim, Etiópia, Gana, Marrocos, Nigéria, Quênia, Somália e Sudão; Américas: Argentina, Brasil, Estados Unidos, México, Peru e Uruguai; Oceania: Austrália e Nova Zelândia. De acordo com outros dados estimados pela FAO (2001), as maiores produções de leite (kg de leite produzido em relação ao peso vivo do animal) de pequenos ruminantes ocorrem nos seguintes países da Europa: Bulgária, Eslováquia, França, Grécia, Itália, República

Tcheca; Ásia: Bangladesh, Palestina, Emirados Árabes Unidos, Iraque, Israel, Omã e Turquia; África: Sudão e Somália. Não foram feitos levantamentos para as Américas e nem para a Oceania. Esses estudos evidenciam a concentração de pequenos ruminantes principalmente na região mediterrânea e na porção central do leste da Europa, no oriente médio e na região mediterrânea da Ásia, no noroeste e centro-leste da África e no sul da América do Sul e da Oceania.

O rebanho ovino norte americano, segundo o USDA (2011), é bem distribuído e representado, em sua maioria, por pequenos e médios produtores. Entretanto, as grandes criações constituem uma fatia percentual importante da criação de ovinos nos Estados Unidos. A produção de carne e de lã são os principais pilares da criação de pequenos ruminantes nos Estados Unidos, porém, o único rebanho que apresentou crescimento na última década foi o leiteiro, enquanto os outros rebanhos já estão consolidados e não apresentaram variações populacionais representativas no mesmo período.

O rebanho ovino brasileiro, segundo o IBGE (2009), cresceu desde o primeiro levantamento, em 1974, até 1992, quando o rebanho ovino nacional era estimado em aproximadamente 20 milhões de cabeças. De 1992 a 2002, o rebanho ovino foi estimado entre 15 e 16 milhões de cabeças, variando pouco, a cada ano, o tamanho do efetivo. A partir de 2002, o rebanho ovino brasileiro vem crescendo gradativamente e o último levantamento indicou quase 17 milhões de cabeças. É importante observar que não só houve aumento no efetivo nacional como também diversificação quanto ao seu local de ocorrência, aumentando expressivamente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte e permanecendo alta, porém com crescimento menos expressivo, na região Nordeste. Já na região Sul, houve um importante decréscimo no rebanho da região desde 1995 até o último levantamento, em 2009. Tal decréscimo pode ser justificado pela baixa nos preços da lã e consequente redução dos rebanhos do sul do Brasil destinados a tal atividade - que eram os mais numerosos da região.

### **2.1.3. Ovinocultura leiteira**

No Brasil, a ovinocultura leiteira é recente e pouco conhecida, mas em alguns países europeus e asiáticos possui grande tradição. Ao longo dos anos, estes países desenvolveram suas raças leiteiras, podendo ser citadas:

**Bergamácia:** originária do norte da Itália e com produção média de 250 kg de leite por lactação. Seu porte avantajado permite a criação dessa raça voltada para corte, além da produção de leite. A raça foi introduzida no Nordeste brasileiro por imigrantes italianos no final do século XIX, apesar de sua adaptação ter sido um pouco dificultada pelas condições extremas da Caatinga brasileira (Borges e Gonçalves, 2007).

**Lacaune:** originária da França central, sendo seu nome associado aos Montes Lacaune, onde vários criadores franceses começaram a cruzar seus animais a fim de melhorar a aptidão leiteira dos mesmos. Dessa forma, criou-se a principal raça ovina francesa, conhecida principalmente por ser a ovelha que produz o leite do qual é feito o famoso queijo Roquefort, oriundo da cidade homônima. Tem boa aptidão leiteira e chega a produzir 200 kg de leite por lactação, apresentando alto percentual de gordura no leite (8%) (Borges e Gonçalves, 2007).

**East Friesian:** originária da região ao leste da Frísia na Alemanha, de onde veio o nome da raça. Também conhecida como Milchschaf, é uma raça antiga com registros de sua existência que datam desde 1530. É predominantemente leiteira, tendo uma produção média de 200-300 kg de leite por lactação (Gootwine e Goot, 1996). Indivíduos dessa raça, quando selecionadas e com o desenvolvimento máximo do seu genótipo e fenótipo, chegaram a produzir até 550 kg de leite por lactação (Sonn, 1979, citado por Thomas, Berger e McKusick, 2000).

**Awassi:** originária do Oriente Médio, onde a sua criação para produção leiteira voltada para a subsistência é muito comum. É uma raça altamente resistente, por ter sido selecionada em regiões inóspitas do Oriente Médio. Sua principal aptidão é a leiteira, apresentando médias próximas a 300 kg por lactação, podendo chegar a



impressionantes 750 litros em alguns poucos relatos. Também é usualmente aproveitada para a produção de lã e carne, ao final de sua vida útil (Mason, 1988).

A ovinocultura leiteira no Brasil é relativamente nova. Os produtores que antes visavam somente a produção de lã ou, quando muito, a de lã e carne, têm agora um interesse crescente na produção de leite. Dessa forma, vários estudos têm sido realizados a fim de aprimorar as raças produtoras de lã, abundantes no Brasil, para a aptidão leiteira.

No estudo de Correa *et al.* (2006), animais meio sangue Corriedale x Milchschaf (East Friesian) apresentaram melhores resultados que suas mães Corriedale, tanto em composição (principalmente em teores de lactose, proteína e gordura) quanto em produção de leite. Esse fenômeno foi ainda mais acentuado quando as ovelhas meio sangue atingiram a segunda parição. O cruzamento entre raças que misturam rusticidade a alta produtividade resulta, usualmente, em raças de maior produtividade, uma vez que essa seleção genética objetiva a maior adaptabilidade do ovino ao local onde é criado. Diversos autores como Arrans, Gabiña e López-Francos (1993), Lana e Lasarte (1998) e Kremer, Barbato e Rosés (2000), todos citados por Correa *et al.* (2006), encontraram resultados semelhantes; porém, com animais meio sangue selecionados de acordo com o seu respectivo local de criação e comparados às suas mães, de raças puras e tradicionalmente não leiteiras. Já Silva (1998), encontrou maiores médias de produção de leite de mestiças de Bergamácia com Corriedale, quando comparadas à produção de Corriedale puras sob as mesmas condições de manejo.

Animais da raça Santa Inês, criados no Brasil e muito bem adaptados ao seu ambiente, não apresentaram diferenças significativas em relação à composição do leite e ao rendimento na produção de queijos típicos de ovelha (como Azeitão, Roquefort e Pecorino), quando comparados a animais de raças ovinas tradicionalmente leiteiras de grande relevância (Ribeiro, 2005).

Ovelhas mexicanas sem raça definida (SRD) apresentaram, sem qualquer tratamento nutricional diferenciando e/ou seleção genética que favorecesse a produção leiteira,

produção de leite semelhante à de muitas das raças ovinas de maior relevância para a ovinocultura leiteira, como Manech, Basco-Bearnaise, Corsa e Churra (Blanco, Gutierrez e Fuentes, 2006).

Wendorf (1995), citado por Haenlein (2005), demonstrou que um queijo cheddar produzido a partir do leite de ovelha é, quando comparado aos produzidos a partir de leites de cabra e vaca, o que apresenta o maior custo de produção. Em compensação, o rendimento obtido com o leite de ovelha é praticamente o dobro daquele resultante do de vaca e de cabra. Em estudos que analisaram a composição do leite de ovelha, foi encontrado um elevado teor de sólidos, que justifica o maior rendimento industrial desse leite, como nos trabalhos de Roda, Duplas e Santos (1987) e Souza *et al.* (2005), que encontraram teores médios de gordura no leite de ovelha acima de 7%.

King (1998), citado por Haenlein (2005), observou um aspecto alarmante no que diz respeito à discrepância entre o número de estudos relacionados ao leite e queijo de ovelha quando comparados aos de cabra e, principalmente, aos de vaca. Outro aspecto importante, enfatizado em suas observações, é que dentre os estudos conduzidos com ovelhas, apenas 5% estão relacionados ao seu leite e produtos derivados.

Haenlein (2005) compilou diversos trabalhos científicos que analisaram a composição do leite de várias raças ovinas. Os resultados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição (%) do leite de diferentes raças ovinas

<b>Raça</b>	<b>Gordura</b>	<b>Proteína</b>	<b>Lactose</b>	<b>Sólidos Totais</b>
<b><u>Grécia</u></b>				
Boutsico	7,68	6,04	4,80	19,30
Vlahiko	9,05	6,52	4,09	20,61
Karagouniko	8,70	6,60	4,08	20,31
Chios	7,90	6,20	4,06	19,08
Epirus	7,85	6,56	4,77	20,13
<b><u>Eslováquia</u></b>				
Tsigai	7,41	5,45	4,99	18,75
<b><u>Espanha</u></b>				
Manchega	7,78	6,01	4,29	18,98
<b><u>França</u></b>				
Lacaune	7,40	5,63	4,67	18,63
<b><u>Inglaterra</u></b>				
Milksheep	6,80	5,16	5,69	18,60
<b><u>Holanda</u></b>				
Texel	9,27	4,53	5,38	20,13
<b><u>Arábia Saudita</u></b>				
Nadji	5,31	4,71	4,48	15,36

Fonte: adaptado de Haenlein (2005)

Ainda no trabalho de Haenlein (2005), foram comparadas diferentes médias de composição do leite de três espécies conhecidamente leiteiras e foi observado que as ovelhas apresentam teores de gordura, proteína e lactose superiores aos das vacas e cabras, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Médias da composição (%) do leite de três espécies leiteiras

<b>Espécie</b>	<b>Composição (%) média do leite</b>			
	<b>Gordura</b>	<b>Proteína</b>	<b>Lactose</b>	<b>Sólidos Totais</b>
<b>Vaca</b>	3,34	3,29	4,66	12,01
<b>Cabra</b>	4,14	3,56	4,45	12,97
<b>Ovelha</b>	7,00	5,98	5,36	19,30

Fonte: adaptado de Haenlein (2005)

## **2.2. Microbiota do leite de ovelha**

Os estudos envolvendo a microbiota do leite de ovelha são escassos, principalmente aqueles envolvendo a microbiota do leite de ovelhas de raças brasileiras e/ou criadas no Brasil. Destes, a maioria indica a predominância de espécies do gênero *Enterococcus*. Medina *et al.* (2001), ao isolarem bactérias ácido-lácticas do leite de ovelha do Nordeste argentino, detectaram uma prevalência de 70% de bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* em comparação a 30% do gênero *Lactobacillus*. Oksuztepe, Patir e Çalicioglu (2005), ao avaliarem a predominância de bactérias ácido-lácticas no leite cru de ovelhas e ao longo da maturação de um queijo feito a partir deste leite cru, observaram que 22 a 33% de bactérias eram do gênero *Enterococcus* dentre todos os isolados, porém, o gênero predominante observado pelos autores foi o *Lactobacillus*. Abd El Aal e Awad (2008) identificaram, através de métodos fenotípicos, amostras de *E. faecium* e *E. faecalis* em 44% dos leites de ovelhas testados em contagens médias de 250 UFC/mL. Arizcun, Barcina e Torre (1997), encontraram prevalência de *E. faecalis* ao isolarem bactérias ácido-lácticas de leite de ovelha assim como encontraram, em menor proporção, *E. faecium*, *E. durans* e *E. avium*.

## **2.3. Alimentos funcionais**

A Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais (SBAF) define os alimentos funcionais como aqueles que produzem efeitos metabólicos, fisiológicos e benéficos à saúde, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos como parte da dieta usual. Eles devem ser seguros para consumo sem supervisão médica, sendo que a sua eficácia e segurança devem ser asseguradas por estudos científicos (SBAF, 2008).

Segundo Heasman e Mellentin (2001), citados por Bianco (2008), um dos primeiros alimentos funcionais do mundo foi o sal de cozinha adicionado de iodo, utilizado para evitar a ocorrência de bócio nos seus consumidores.

O interesse no estudo dos alimentos funcionais começou com a observação das características associadas à maior longevidade e saúde de certos povos, como o

consumo pelos franceses de vinho tinto - e os benefícios dos seus compostos fenólicos - ou o consumo pelos esquimós de pescado com altos teores de ômega três e seis, substâncias que promovem a saúde do sistema cardiovascular, além de outros benefícios (Anjo, 2004).

Os alimentos funcionais são produtos com demanda crescente na atualidade, quando se observa um aumento na expectativa de vida da população mundial associado a uma vida cada vez mais estressante e sedentária. Os avanços da medicina têm contribuído para prolongar a expectativa de vida média da população - por meio de diagnósticos cada vez mais precisos de doenças antes letais e não diagnosticáveis. Esses aspectos têm levado os seres humanos a preocuparem-se com uma alimentação saudável e balanceada. Nesse contexto, os alimentos funcionais tiveram um enorme estímulo para o seu crescimento e despertaram interesse das grandes indústrias alimentícias (Hasler, 2000).

Um dos benefícios e possível causa do sucesso dos alimentos funcionais é o fato de incluírem em produtos familiares (como queijos, iogurtes, entre outros) as suas características benéficas ao consumidor, não implicando em mudanças radicais no hábito alimentar (Roberfroid, 1999).

Cruz, Faria e Van Dener (2007) reiteraram que os alimentos funcionais também são conhecidos por nomes como nutracêuticos, terapêuticos ou medicinais, apesar de que, dependendo do autor ou da legislação vigente, alguns desses termos não podem ser usados como sinônimos. Na legislação europeia e para certos autores, por exemplo, os alimentos nutracêuticos são aqueles vendidos no formato de drogas em farmácias e que possuem uma ou mais substâncias extraídas da natureza com o objetivo específico de prevenir ou remediar uma doença. A característica de não ser também um alimento é a diferença considerada para o alimento funcional, que deve ter valor nutritivo (Moraes e Colla, 2006).

Um dos alimentos funcionais mais conhecidos hoje em dia é aquele suplementado com microrganismos com características probióticas. Esse alimento normalmente é de origem animal, mais comumente de origem láctica e é adicionado de bactérias e/ou

leveduras que, ao serem consumidas juntamente com o alimento em condições viáveis e quantidades adequadas, vão promover uma gama de benefícios à saúde do seu consumidor (Reig e Anesto, 2002).

## **2.4. Alimentos que veiculam microrganismos probióticos**

### **2.4.1. Conceito**

A palavra probiótico tem o significado de “para a vida” de acordo com o prefixo e sufixo gregos utilizados para designá-la (Neves, 2005). Metchnikoff, no início do século XX, introduziu a idéia de que a maior longevidade dos caucasianos seria devida aos seus hábitos alimentares, que incluíam o consumo de leites fermentados e o efeito benéfico que os microrganismos presentes nesses produtos exercem sobre os mesmos ao longo dos tempos (Holzapfel e Schillinguer, 2002).

O termo probiótico foi inicialmente descrito por Lilly e Stillwell em 1965 como “uma substância produzida por um microrganismo que estimula o crescimento de outro microrganismo” sendo relatado, inicialmente, como um análogo dos antibióticos. Alguns anos depois, em 1974, Parker definiu os probióticos como “organismos e substâncias que contribuem para o balanço microbiano intestinal”. Fuller, em 1989, definiu os probióticos como “um suplemento alimentar com micróbios que afeta benéficamente o animal hospedeiro ao melhorar seu balanço microbiano intestinal”. Em 1996, Conway, após analisar as constantes mudanças nas definições de probiótico, elaborou uma definição que tornou-se universal até os dias de hoje: “probiótico é uma preparação com microrganismos vivos, que, aplicado a homens ou animais, afeta benéficamente seu hospedeiro melhorando as propriedades da sua microbiota indígena” (Salminen *et al.*, 1999).

Um dos responsáveis pelo início da utilização e divulgação dos alimentos que contêm microrganismos probióticos foi o governo do Japão, onde o *Foshu* (*foods for specified health use*) foi introduzido a fim de desvincular os alimentos funcionais dos produtos farmacêuticos e alopáticos. O *Foshu* foi criado com o propósito de reduzir os gastos com saúde pública e conter o avanço de doenças crônico-degenerativas em idosos, principalmente. Nesse contexto, o cientista Minoru Shirota, apoiado pelo presidente da

Yakult, pôde colocar em prática sua máxima: “prevenir doenças mais do que tratá-las; um intestino saudável leva a uma vida longa” por meio da venda dos famosos leites fermentados que têm o primeiro nome do dono da empresa, Yakult Honsha. Um dos primordiais e mais famosos microrganismos probióticos produtores de ácido láctico, *Lactobacillus casei shirota*, foi então apresentado comercialmente e conquistou um enorme sucesso que se mantém até a atualidade (Heasman e Mellentin, 2001, citados por Bianco, 2008).

No entanto, atualmente, o conceito mais aceito de probióticos é o proposto pela FAO/OMS (2002): “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro”.

#### **2.4.2. Microrganismos probióticos**

Os microrganismos probióticos, depois de ingeridos, devem sobreviver às condições de estresse do trato gastrintestinal, como o suco gástrico, os sais biliares e as enzimas estomacais e intestinais. Assim, mantêm-se viáveis e em quantidades desejáveis - população mínima de  $10^7$  UFC/mL ou g - no seu local de ação específico - intestino delgado ou grosso - a fim de exercerem efeitos benéficos ao seu hospedeiro (Oliveira *et al.*, 2002)

Quanto ao aspecto tecnológico, os microrganismos devem manter-se viáveis e em quantidades apropriadas no produto até o final da sua data de validade, para promoverem os benefícios à saúde ao seu consumidor (Saad, 2006). Além disso, para um microrganismo ser considerado probiótico, ele usualmente: não apresenta patogenicidade; é Gram positivo, catalase negativo, produtor de ácidos e resistente aos mesmos; apresenta, de preferência, especificidade ao hospedeiro; é resistente à bile; é, de preferência, viável e/ou estável em seu veículo; e não é capaz de transmitir genes de resistência a outros microrganismos (Santos *et al.* 2003). Os microrganismos probióticos são, preferencialmente, aqueles nativos ao consumidor alvo por serem assim compatíveis e também não serem reconhecidos como antígenos pelo seu sistema imune (Klaenhammer e Kullen, 1999).

#### **2.4.2.1. O gênero *Bifidobacterium***

Dentre os gêneros mais conhecidos e estudados de microrganismos probióticos estão as bifidobactérias, isoladas pela primeira vez no final do século XIX por Tissier (Gomes e Malcata, 2002). As principais espécies desse gênero que apresentam interesse industrial para produção de leites fermentados com apelo probiótico são: *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* e *B. termophilum*, normalmente encontradas no trato gastrintestinal, na vagina e na boca dos seres humanos e animais. Algumas dessas bifidobactérias são, todavia, oriundas do ambiente ou de alimentos, normalmente de origem animal (Botelho, 2005). As bifidobactérias são anaeróbias estritas e colonizam o intestino grosso, principalmente o cólon, dos seres humanos nos seus primeiros dias de vida, se proliferam intensamente até atingirem uma população estável na idade adulta e, a partir de então, começam a decrescer gradativamente até o final da vida (Shah, 2007).

#### **2.4.2.2. O gênero *Lactobacillus***

Outro gênero muito conhecido de microrganismos probióticos é *Lactobacillus*, que foi isolado e identificado pela primeira vez por Moro, em 1900, a partir das fezes de lactentes amamentados com colostro materno. O nome inicial dado a essas bactérias foi *Bacillus acidophilus*, que foi mudado posteriormente para *L. acidophilus*. Dentre as bactérias desse gênero já identificadas e de maior importância e uso na produção de alimentos, principalmente nos derivados lácteos de apelo probiótico, estão: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* e *L. tolerans* (Klaenhammer e Kullen, 1999). São conhecidas 56 espécies diferentes deste gênero com características probióticas, em sua maioria microaerófilas e com pH ótimo de crescimento entre 5,5 e 6,2 (Botelho, 2005).



#### **2.4.2.3. O gênero *Weisella***

O gênero *Weisella* foi descrito recentemente por Collins e Martinez-Murcia entre 1990 e 1993, ao trabalharem com isolamento de microrganismos em um tipo de salsicha grega. Os autores observaram que *Leuconostoc paramesenteroides* diferia filogeneticamente de *L. mesenteroides* e se enquadrava filogeneticamente com lactobacilos das espécies *L. confusus*, *L. haloterans*, *L. kandleri*, *L. minor* e *L. viridescens*. Foi então descrito o gênero *Weisella*, que incorporou os microrganismos mencionados além de outro descoberto no estudo em questão: *W. hellenica*. A espécie *W. thailandensis* foi descoberta e descrita alguns anos depois, assim como *W. cibaria* e *W. confusa*. As bactérias desse gênero se enquadram na definição clássica fornecida para probióticos e têm origem diversificada, desde vegetais e produtos *in natura*, a variações desses produtos fermentados. Espécies de *Weisella* também foram isoladas do trato gastrointestinal de animais domesticados como os suínos (Bjorkroth *et al.*, 2002).

#### **2.4.2.4. O gênero *Enterococcus***

A utilização de microrganismos do gênero *Enterococcus* como probióticos tem sido questionada devido a fatores de virulência de algumas espécies e devido à presença de genes de resistência a antimicrobianos transmissíveis a outras bactérias ácido-lácticas. *E. faecium* é mais comumente encontrada em produtos veiculando probióticos. Quando comparado com os outros microrganismos probióticos, os enterococos apresentam algumas vantagens quanto à sua resistência e pouca seletividade para crescimento e multiplicação, não sendo exclusivamente acidófilo, microaerófilo e/ou mesófilo como muitos dos microrganismos ácido-lácticos. Devido aos estudos comprovando possível patogenia e transmissão cruzada de resistência a potentes antimicrobianos - como a vancomicina - a outros microrganismos, o uso das espécies desse gênero em formulações humanas é cada vez mais raro. Porém, como os estudos são normalmente em modelos experimentais ou *in vitro*, não sendo muitas vezes conclusivos, os enterococos ainda são muito utilizados em produtos destinados a animais domésticos e vários estudos comprovam a sua eficácia. Bactérias desse gênero são comumente isoladas das fezes e do leite dos mamíferos (Redondo, 2008)

#### **2.4.2.5. O gênero *Saccharomyces***

Os probióticos desse gênero diferem do conceito tradicional de microrganismos probióticos por serem leveduras e não caracterizarem-se morfologicamente de acordo com a maior parte destes. Poucas espécies são utilizadas e conhecidas, mas apresentam grandes diferenciais que tornam vantajoso o seu uso. *Saccharomyces boulardii* - utilizado em probióticos para humanos - e o *S. cerevisiae* - utilizado em probióticos para os demais animais - por serem leveduras, podem ser comercializadas liofilizadas, o que aumenta a validade e viabilidade do microrganismo no produto. Ademais não são sensíveis aos antimicrobianos, o que possibilita o seu uso na manutenção de uma microbiota saudável e funcional em indivíduos submetidos a tratamentos com tais medicamentos. *Saccharomyces boulardii* foi identificada por Henri Boulard, em 1920, na Indochina, quando buscava uma levedura termoresistente para a produção de vinhos e acabou encontrando uma levedura que crescia nas cascas das lichias - fruta local - e era eficaz no tratamento de diarreias causadas por cólera, comuns naquele local e época (Martins *et al.* 2005).

#### **2.4.3. Efeitos benéficos dos microrganismos probióticos**

Em todo o trato gastrintestinal, a porção mais povoada por microrganismos é o cólon, no intestino grosso, sendo responsáveis por 35-50% do volume dessa porção intestinal de um indivíduo adulto. A microbiota intestinal, quando em equilíbrio, consegue impedir que microrganismos patogênicos multipliquem e exerçam ações maléficas ao seu hospedeiro. Por outro lado, quando em desequilíbrio, a microbiota intestinal pode propiciar o crescimento de microrganismos patogênicos (Isolauri, Salminen e Ouwehand, 2004).

Dentre os mecanismos de ação dos microrganismos probióticos envolvidos na supressão de bactérias indesejáveis estão: competição nutricional; produção de ácidos, principalmente láctico a partir da fermentação da lactose; produção de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; modulação imunológica do hospedeiro pelo aumento dos níveis de imunoglobulinas, principalmente IgA, citocinas e atividade de macrófagos, principalmente *Natural Killers*, NK, na luz intestinal. Essa

modulação imunológica também está associada à redução de processos inflamatórios na luz dos intestinos, principalmente no cólon, no intestino grosso. (Saad, 2006).

Em trabalho realizado por Gill *et al.* (2001), indivíduos idosos submetidos ao consumo de leite fermentado por *Bifidobacterium lactis* apresentaram, ao final do período experimental de dois meses, melhoras substanciais na resposta imune e nas concentrações de células imunitárias sanguíneas. Todas as células do grupo dos linfócitos T mensuradas apresentaram números elevados em comparação ao dia zero do experimento assim como as células NK, importantes devido a sua atividade imunológica e tumoricida.

Vários são os trabalhos que comprovam a eficácia da inibição *in vitro* de microrganismos potencialmente probióticos contra agentes patogênicos. Garcia *et al.* (2006) observaram a inibição de amostras de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* var. Typhimurium e *Clostridium perfringens* por amostras de *Lactobacillus acidophilus*. Alvim (2011) observou a inibição de amostras de diversos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. enterica* var. Typhimurium, entre outros, por amostras de *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. murinus* e *Weissella paramesenteroides*. Costa (2010), em estudo semelhante, observou inibição das mesmas bactérias patogênicas por *L. rhamnosus* e também *W. paramesenteroides*. Em um trabalho conduzido com crianças em creches com sintomas de diarreias causadas principalmente por rotavírus, Weisman, Asli e Alsheikh (2005) observaram uma melhora da doença mais rápida em crianças que consumiram leite fermentado contendo *L. reuteri* do que em crianças do grupo controle.

Outro importante benefício do consumo de alimentos probióticos é a redução dos efeitos indesejáveis causados pela intolerância à lactose, uma vez que os microrganismos nele presentes auxiliam a digestão da lactose na luz intestinal, por possuírem a enzima  $\beta$ -D-galactosidase, que é ausente ou produzida em pequena quantidade pelo indivíduo intolerante. Desse modo, o desconforto abdominal associado às diarreias osmóticas promovidas pelo excesso de lactose não ocorre com tanta intensidade (Saad, 2006). As diarreias causadas pela síndrome do intestino irritado (IBS), de causa ainda desconhecida pela medicina, acometem uma importante

parcela da população mundial. No estudo de Fan *et al.* (2006), a administração de um produto com microrganismos probióticos dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* por um ano, em pacientes com sintomas de IBS, reduziu os sintomas em 73% dos pacientes analisados.

Microrganismos probióticos também estão associados à redução de alergias a proteínas alimentares, pela indução da quebra de proteínas com potencial alergênico no trato gastrointestinal, possivelmente reduzindo a sua alergenicidade (Morais e Jacob, 2006). Um estudo em 1997, de Majaama e Isolauri, demonstrou redução de alergias atópicas, associadas ao consumo de leite, por meio do consumo de um leite fermentado com uma espécie de lactobacilo conhecidamente probiótico.

A redução de câncer, principalmente de cólon, também tem sido associada ao consumo de alimentos contendo probióticos, devido à inibição de enzimas pró-carcinogênicas e à imunomodulação na luz intestinal (Kaur, Chopra e Saini, 2002). Esta imunomodulação também reduziu a incidência de diarreias causadas por *Clostridium difficile*, quando tratadas com alimento contendo microrganismos probióticos do gênero *Streptococcus*. Observou-se que, para esse tipo de diarreia, o tratamento mencionado foi mais eficiente em pacientes nos quais a patologia era recorrente (Isolauri, Salminen e Ouwehand, 2004).

O aumento da frequência de defecação em indivíduos constipados é um dos grandes apelos da indústria de lácteos. A redução da constipação foi comprovada em um estudo realizado por Matsumoto *et al.* (2006), ao avaliarem a frequência de movimentos intestinais e de defecação, além da consistência das fezes, em indivíduos com histórico de constipação, submetidos ao consumo diário de leite fermentado contendo *L. casei* durante um mês. As causas para a melhora da constipação nos indivíduos estudados foram: aumento no número de lactobacilos e bifidobactérias nas fezes, amolecimento das fezes e maior frequência de movimentos intestinais.

Por último, mas não menos importante, o consumo de alimentos probióticos tem sido associado à ação de diversas amostras de *L. acidophilus* e *L. casei* na redução dos níveis séricos de colesterol. Entre os mecanismos envolvidos nesta redução estão:

incorporação e assimilação do colesterol na luz do intestino à membrana celular nos processos de multiplicação dessas bactérias, assim como redução da re-esterificação de sais biliares por essas mesmas bactérias (Liong e Shah, 2005). No trabalho de Hlivak *et al.* (2005), indivíduos idosos saudáveis foram submetidos ao consumo de um produto contendo *E. faecium* probiótico e foi observada a redução sérica de colesterol, dada principalmente pela redução do LDL.

O interesse pelos efeitos benéficos à saúde promovidos pelas bactérias e leveduras com características probióticas tem provocado um aumento mundial nas vendas de produtos alimentícios contendo esses microrganismos. Os efeitos benéficos associados ao consumo de alimentos probióticos podem ser garantidos quando os microrganismos são ingeridos, diariamente, na grandeza de  $10^8$ - $10^9$  UFC/g de produto, por um período mínimo de 15 dias (Araújo, 2007).

#### **2.4.4. Riscos associados aos microrganismos probióticos**

Algumas espécies de microrganismos comumente utilizados como probióticos tem tido o seu uso questionado devido a possíveis riscos associados ao uso destes microrganismos. Em geral, a maioria dos microrganismos probióticos são definidos como GRAS (geralmente conhecido como seguro, em tradução livre), o que não é o caso daqueles pertencentes ao gênero *Enterococcus*, ao qual diversas patogenias - como infecções cardiovasculares, do trato urinário e do sistema nervoso, entre outras - podem ser associadas (Murray, 1990). A grande preocupação que cerca a utilização de enterococos está na possibilidade de alguma de suas amostras probióticas serem capazes de transmitir resistência a antimicrobianos como a vancomicina – expressa por genes como o *vanA* e *vanB* (Franz, Holzapfel e Stiles, 1999).

Muitos são os trabalhos que conseguiram provar a presença de resistência múltipla a antimicrobianos por enterococos probióticos – como o de Vankerckhoven *et al.* (2008) – assim como os que conseguiram provar a capacidade desses enterococos de receber genes de resistência a antimicrobianos de amostras patogênicas – como o de Lund e Edlund (2001). Porém, nenhum trabalho ainda conseguiu provar a

transferência desses genes de amostras comerciais de bactérias probióticas gênero *Enterococcus* a amostras virulentas do mesmo gênero.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Aquisição do leite de ovelha e amostragem**

O leite de ovelha do experimento foi obtido da fazenda do Dr. Octávio Rossi de Moraes, localizada em Jaboticatubas - Minas Gerais, que possui um rebanho de aproximadamente 50 ovelhas das raças Lacaune, Santa Inês e seus cruzamentos. Vinte amostras individuais de leite de animais geneticamente diferentes foram obtidas por ordenha manual, com limpeza das mãos do ordenhador e dos tetos do animal com hipoclorito de sódio a 0,5%, seguido de secagem com papel toalha após 30 segundos. As amostras foram coletadas diretamente em frascos de vidro estéreis e acondicionadas em isopor com gelos recicláveis até chegarem ao laboratório de Microbiologia de Leite e Produtos Derivados do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG).

#### **3.2. Avaliação Microbiológica**

##### **3.2.1. Isolamento, enumeração, caracterização fisiológica e morfo-tintorial de bactérias ácido-lácticas isoladas de leite de ovelha**

Um mL de cada amostra de leite de ovelha foi diluído em nove mL de salina peptonada tamponada (0,85% NaCl e 0,1% peptona) correspondendo à diluição de  $10^{-1}$ . Em seguida, 0,1 mL da diluição obtida foi diluída em 9,9 mL de salina peptonada tamponada correspondendo à diluição de  $10^{-3}$ . A repetição desse processo com a diluição  $10^{-3}$  correspondeu à diluição  $10^{-5}$ . A partir de cada uma das diluições obtidas, uma alíquota de 0,1 mL foi semeada com alça de *Drigalski* na superfície de placas de Petri contendo os meios de cultura ágar MRS de *Man*, *Rogosa* e *Sharpe* (*Difco*, Detroit, Michigan, Estados Unidos) e ágar M17 (*Difco*). As placas contendo o meio de cultura MRS (*Difco*) foram incubadas a 37°C, durante 96 horas, enquanto aquelas com o meio de cultura M17 (*Difco*) foram incubadas a 32°C, durante 96 horas, ambos e m

aerobiose, dentro de estufa bacteriológica, de acordo com a metodologia de Resende (2010).

A enumeração foi realizada após a incubação, sendo consideradas placas contendo de 25 a 250 UFC, diferenciando-se colônias com morfotipos diferentes. A partir de colônias apresentando aspectos morfológicos diferentes, foram feitos esfregaços em lâminas para coloração pelo método de Gram, a fim de selecionar bactérias Gram positivo, característica comum a todas as bactérias ácido-lácticas. Além disto, a partir dessas mesmas colônias, foram feitos testes de catalase, no qual uma gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) foi colocada, em lâmina, sobre uma amostra de cada morfotipo de colônia encontrado, a fim de se selecionar bactérias ácido-lácticas catalase negativo - com ausência de produção de bolhas no teste de catalase - devido ao fato de todas as bactérias ácido-lácticas se enquadrarem nesse grupo.

Os microrganismos que cresceram nos meios de cultura iniciais foram inoculados em tubos de ensaio com rosca contendo cinco mL de caldo correspondente ao meio em que foram isolados e, em seguida, incubados em aerobiose a 32°C ou 37°C (M17 e MRS, *Difco*, respectivamente) durante 24 a 48 horas, período que foi determinando pelo desenvolvimento de turbidez no caldo no qual foram inoculados. Decorrido esse período, uma alíquota de 800 µL de cada tubo foi transferida para tubo *Eppendorf* e adicionada de glicerol esterilizado (200 µL); sendo, em seguida, congelada a -18°C para posterior utilização.

### **3.2.2. Identificação dos microrganismos isolados de bactérias ácido-lácticas de leite de ovelha por técnicas de biologia molecular**

As amostras congeladas foram destinadas a análises de biologia molecular, com a finalidade de identificação das espécies isoladas, por intermédio de análise de restrição do DNA ribossomal (ARDRA) pela amplificação por reação de polimerização em cadeia (PCR) da região espaçadora 16S-23S do rDNA, conforme metodologia proposta por Moreira *et al.* (2005); Tannock *et al.* (1999) e Tisala-Timisjarvi e Alatossava (1997). Todos os microrganismos isolados foram submetidos ao sequenciamento pelo método de Sanger, da região 16S do rDNA, amplificada pelos primers 57F (forward) e 1492R (reverso), para confirmação da identificação por PCR-

ARDRA 16S-23S, de acordo com metodologia proposta por Reysenbach, Longnecker e Kirshtein, (2000).

A extração do DNA total dos microrganismos isolados nos meios de cultura ágar MRS (*Difco*) e ágar M17 (*Difco*) foi realizada a partir do cultivo recente em caldo MRS (*Difco*) ou M17 (*Difco*), incubados sob aerobiose, a 37°C ou 32°C, respectivamente, durante 24 a 48 horas, como descrito anteriormente.

#### Obtenção das células sem parede e sem membrana

De cada cultivo dos microrganismos que cresceram em caldo MRS (*Difco*) ou M17 (*Difco*), cinco mL foram centrifugados a 3000 g durante 10 minutos, à temperatura de 4°C, para obtenção dos *pellets*. Os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* obtidos foram suspensos em um mL de cloreto de lítio (1M), transferidos para tubos *ependorf* e incubados sob agitação à 37°C, por uma hora, com a finalidade de extrair proteínas associadas à parede bacteriana. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 g, durante 10 minutos, descartando-se os sobrenadantes. Os *pellets* obtidos foram suspensos em um mL de tampão para protoplastos (50 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA e 10 mg de lisozima mL<sup>-1</sup>), sendo 200 µL de enzima e 800 µL de tampão com RNase, e incubados por uma hora, sob agitação, a 37°C. Os tubos foram centrifugados a 14000 g, durante um minuto e os sobrenadantes foram descartados.

#### Extração de DNA total

O DNA total dos protoplastos obtidos de cada amostra foi extraído com auxílio do *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* da companhia *Promega Corporation* (Madison, Wisconsin, Estados Unidos), segundo instruções do fabricante.

#### Eletroforese em gel de agarose

Com o objetivo de visualizar a quantidade de DNA total extraído na etapa anterior, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Cinco µL de cada amostra de DNA total extraído foram misturados a um µL de tampão (glicerol



adicionado de azul de bromofenol) e, então, encaminhados à eletroforese em gel de agarose (1%), adicionado de 10 µL de brometo de etídeo (1%), utilizando 100 V, durante 45 minutos. Paralelamente, no mesmo gel foi utilizado também o marcador de peso molecular de 1 Kb (mil pares de bases). Ao término da corrida, os géis foram fotografados, utilizando equipamento de fotodocumentação com luz ultravioleta.

### Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

As amostras de DNA total foram submetidas à reação de PCR, visando amplificar a região intergênica que codifica as sub-unidades ribossomais 16S – 23S, de acordo com metodologia proposta por Tisala-Timisjarvi e Alatossava (1997). Esta região do DNA é bastante variável entre as espécies de bactérias ácido-lácticas, porém, bastante conservada em bactérias da mesma espécie, sendo então utilizada em pesquisas de identificação microbiana, ao nível molecular. Os reagentes utilizados para a reação de PCR 16S-23S foram:

DNA total diluído	5,0 µL
PCR Master Mix 2x*	30 µL
Iniciador senso (16S)**	0,6 µL
Iniciador reverso (23S)***	0,6 µL
Água deionizada	23,8 µL

\* *Promega Corporation*

\*\* *Primer 16-1a. 5' – GATCGCTAGTAATCG – 3'*

\*\*\* *Primer 23-1b. 5' – GGGTTCCCCCATTCGGA – 3'*

Em seguida, os tubos *Eppendorf* contendo as amostras foram colocados dentro de uma máquina termocicladora *Veriti™ 96 – Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos)*, sendo utilizado o seguinte programa:

<i>Desnaturação</i>	95° C	2 minutos e 30 segundos
	94° C	30 segundos
<i>Anelamento</i>	55° C	1 minuto
<i>Extensão</i>	72° C	1 minuto
<i>Extensão final</i>	72° C	10 minutos
	4° C	Tempo indefinido

Por conseguinte, cinco µL de cada produto de PCR foram misturados a um µL do tampão glicerol com azul de bromofenol e então submetidos à nova eletroforese em

gel de agarose (1,4%), adicionado de 10 µL de brometo de etídeo (1%), utilizando 100 V, por 90 minutos. Ao final da corrida, os géis foram fotografados, para visualização das regiões amplificadas.

Restrição enzimática dos produtos de PCR 16S-23S rDNA com endonucleases específicas (ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

Após a obtenção dos produtos de PCR, os mesmos foram digeridos com enzimas de restrição - endonucleases - para a identificação das espécies de bactérias ácido-lácticas baseando-se na compilação de sequências de nucleotídeos disponíveis no *GenBank*, de acordo com a metodologia de Tannock *et al.* (1999). As enzimas utilizadas foram: *Sph I*, *Nco I*, *Nhe I* (que clivam o DNA dentro do gene 16S); *Ssp I*, *Csp 45*, *Eco RV*, *Dra I*, *Vsp I*, *Eco RI* (que clivam o DNA dentro da região intergênica); *Hinc II*, *Hind III* e *Avr II* (que clivam o DNA dentro do gene 23S). Todas as enzimas utilizadas foram adquiridas da companhia *Promega Corporation*. Como as enzimas necessitam de BSA - albumina sérica bovina - para sua melhor atividade, foi preparada a seguinte mistura:

DNA (Produto de PCR)	3,5 µL
Tampão 10 x	1,0 µL
BSA 10 x	1 µL
Água deionizada	3,9 µL
Enzima	0,1 µL

Após o preparo dos tubos, os mesmos foram mantidos a 37°C por duas horas para que houvesse a reação de restrição enzimática. Em seguida, 9,5 µL de cada produto de restrição foram misturados com dois µL do tampão glicerol com azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%), adicionados de 10 µL de brometo de etídeo (1%), utilizando 100V, por 90 minutos. Os resultados foram fotografados e o perfil de restrição de cada produto de PCR foi comparado com o perfil de restrição característico de cada espécie de bactéria ácido-láctica.

### Sequenciamento do gene 16S rDNA

Todos os microrganismos isolados foram encaminhados para sequenciamento no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, para confirmar o gênero e a espécie. Estes microrganismos isolados tiveram o gene 16S rDNA sequenciado pelo método de Sanger, utilizando-se um sequenciador automático MegaBACETM 1000 (*GE HealthCare*, Buckinghamshire, Reino Unido). Os primers usados foram o 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Reysenbach, Longnecker e Kirshtein, 2000). O programa utilizado na termocicladora para amplificar o gene 16S rDNA para sequenciamento foi o mesmo mencionado para amplificação de região intergênia 16S-23S. O produto da etapa anterior foi purificado com o auxílio do *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System*, também da *Promega Corporation*.

### **3.3. Teste *in vitro* de sensibilidade ao pH gástrico**

A técnica utilizada foi adaptada de Neumann (1991). Os microrganismos isolados foram ativados em caldo MRS (*Difco*) e incubados a 37° C, sob aerobiose, durante 48 horas. Os microrganismos ativados foram distribuídos em dois tubos *Eppendorf* distintos sendo um deles uma diluição 10x em solução salina 0,9%, pH 7.0 (controle) e o outro uma diluição em solução salina 0,9%, pH 2.0 (suco gástrico artificial). Os tubos foram incubados a 37°C por três horas e, posteriormente, foram centrifugados (13000 g por um minuto). O sobrenadante foi descartado e os *pellets* com as colônias foram ressuspendidos em caldo MRS (*Difco*) puro. A fim de avaliar a viabilidade das células, foram aplicados 200 µL/poço dos inóculos do controle e das colônias tratadas com suco gástrico artificial em uma microplaca de ELISA com 96 poços que foi incubada em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 - Molecular Devices) a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD<sub>620nm</sub> a cada 30 minutos, durante 15 horas, e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Origin 8.5 pela fórmula  $(1-SG/CT) \times 100$ , sendo que SG e CT correspondem a área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e o controle, respectivamente. Esse

teste foi realizado em triplicata (três poços contendo a mesma amostra tratada com suco gástrico artificial e três poços contendo a mesma amostra controle) com duas repetições.

### **3.4. Teste *in vitro* de sensibilidade aos sais biliares**

Para o teste de sensibilidade a sais biliares utilizou-se o protocolo estabelecido por Walker e Gilliland (1993), adaptado para microplacas de ELISA com 96 poços. Os microrganismos isolados foram ativados em caldo MRS (*Difco*) e incubados a 37° C, sob condições de aerobiose, durante 48 horas. Cada microrganismo ativado foi distribuído em um tubo *Eppendorf* na diluição de 4% (v/v). A partir dessa diluição, 100 µL foram transferidos a um poço da placa de ELISA contendo 100 µL de caldo MRS (*Difco*) puro e outros 100 µL foram transferidos a um poço da placa de Elisa contendo MRS (*Difco*) com 0,6% (p/v) de sais biliares (*oxgall*, BD, Detroit, Michigan, Estados Unidos). A microplaca de ELISA com 96 poços foi então incubada em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 - Molecular Devices, Sunnyvale, California, Estados Unidos) a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD<sub>620nm</sub> a cada 30 minutos, durante 18 horas, e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Origin 8.5 pela fórmula  $(1-SB/CT) \times 100$ , sendo que SB e CT correspondem a área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com sais biliares e o controle, respectivamente. Esse teste foi realizado em triplicata (três poços contendo a mesma amostra tratada com sais biliares e três poços contendo a mesma amostra controle) com duas repetições.

### 3.5. Teste *in vitro* de susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de susceptibilidade antimicrobiana, pelo princípio de difusão da droga, utilizando-se discos e medindo-se o diâmetro dos halos de inibição conforme proposto por Charteris (1998).

Para a realização dos testes a seguir, as bactérias ácido-lácticas isoladas dos leites de ovelha foram previamente cultivadas em caldo MRS (*Difco*), incubando-se a 37°C por 48 horas, sob aerobiose. Após o crescimento dos microrganismos, cada microrganismos ativado foi transferido para tubo de ensaio com rosca contendo 3,5 mL de salina 0,9% até que fosse atingida concentração equivalente a escala 0,5 de McFarland (que corresponde a uma população de 10<sup>8</sup> UFC/mL). Com uma zaragotoa estéril, cada cultura foi espalhada em uma placa de Petri tipo pizza (diâmetro de 14 cm) até que toda a superfície contendo ágar MRS (*Difco*) fosse coberta. Em seguida, foram distribuídos, de forma equidistante, 10 discos (*Oxoid*, Basingstoke, Inglaterra) contendo antimicrobianos de grupos químicos distintos. Foram utilizadas drogas pertencentes aos seguintes grupos químicos:

- inibidores de síntese de parede celular, com ação bactericida, como os beta-lactâmicos: penicilina (PEN, 10 U) e oxacilina (OX, 1 µg); glicopeptídeos: vancomicina (VA, 30 µg); e cefalosporinas de terceira geração: ceftazidima (CAZ, 30 µg);
- inibidores de síntese de proteínas, com ação bacteriostática, como os macrolídeos: eritromicina (E, 5µg); tetracilinas: tetraciclina (TE, 30µg); aminoglicosídeos: gentamicina (CN, 10 µg); e estreptomicina (S, 30 µg), lincosamidas: clindamicina (DA, 2 µg);
- inibidores da multiplicação celular, com ação bactericida, como as quinolonas de terceira geração: ciprofloxacina (CIP, 5 µg).

As placas de Petri tipo pizza, após a distribuição dos discos, foram incubadas em aerobiose a 37°C durante 48 horas. O controle de qualidade dos discos contendo os antimicrobianos foi realizado utilizando-se amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922, de acordo com técnica proposta por Charteris *et al.* (1998). Em seguida, com auxílio de paquímetro digital (*Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda*), foram feitas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição.

Este teste foi realizado em duplicata (os mesmos discos de antimicrobianos para duas placas de Petri tipo pizza contendo o mesmo isolado ativado) com duas repetições.

Os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos das amostras avaliadas foram caracterizados de acordo com o 15º suplemento informativo da ANVISA (2005) que pode ser observada no quadro abaixo.

Quadro 1. Níveis de susceptibilidade de *Enterococcus* spp. a antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar MRS (*Difco*)

Antimicrobiano	Nível de Susceptibilidade		
	Resistente	Moderadamente Sensível	Sensível
Ceftazidima (30 µg)	≤ 14	15 a 17	≥ 18
Ciprofloxacina (05 µg)	≤ 13	14 a 18	≥ 19
Clindamicina (02 µg)	≤ 8	9 a 11	≥ 12
Eritromicina (15 µg)	≤ 13	14 a 22	≥ 23
Gentamicina (10 µg)	≤ 12	-	≥ 13
Oxacilina (01 µg)	≤ 18	19 a 20	≥ 21
Penicilina (10 UI)	≤ 14	-	≥ 15
Estreptomicina (10 µg)	≤ 11	12 a 14	≥ 15
Tetraciclina (30 µg)	≤ 14	15 a 18	≥ 19
Vancomicina (30 µg)	≤ 14	15 a 16	≥ 17

Fonte: adaptado de ANVISA (2005)

### 3.6. Teste de antagonismo *in vitro* entre amostras isoladas e contra microrganismos indicadores

Para a realização dos testes de antagonismos, as bactérias ácido-lácticas isoladas do leite de ovelha foram previamente cultivadas em caldo MRS (*Difco*), a 37°C por 48 horas, sob aerobiose. Após duas ativações, cinco µL de cada cultivo de microrganismo foram colocados sobre o centro da superfície de uma placa de Petri, contendo ágar MRS (*Difco*), que foi incubado sob aerobiose a 37°C durante 48 horas. Após este período, as placas foram retiradas das câmaras de incubação com os *spots* no centro da placa devidamente crescidos. Foi colocado clorofórmio nas tampas destas placas, deixando-o agir por 30 minutos sob luz UV. Com isto, eliminou-se os microrganismos que cresceram nos *spots* e foi possibilitada a avaliação da ação de supostas substâncias inibidoras produzidas pelas bactérias e liberadas no meio de cultura. Em seguida, foram colocados 3,5 mL de ágar semi-sólido (0,75% BactoAgar, *Difco*, em caldo BHI, *Brain Heart Infusion*, ou MRS, *Difco*), contendo as bactérias reveladoras. A metodologia deste teste foi inicialmente proposta por Tagg, Dajami e Wannamaker (1976).

Microrganismos patogênicos (*Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28853, *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) e microrganismos de referência (amostra 23 ou 20.4, para o teste com a amostra 23, isoladas de leite de ovelha) foram inoculados em caldo BHI (*Difco*) e MRS (*Difco*), respectivamente, e incubados a 37°C durante 24 horas. Para todos os microrganismos reveladores foram feitas duas ativações. Após crescimento dos microrganismos incubados nos caldos mencionados, 100 µL destes foram transferidos para o ágar semi-sólido (BHI ou MRS, *Difco*) que foi então vertido sobre placas de ágar MRS (*Difco*), após os 30 minutos de ação do clorofórmio e da luz UV (ultravioleta). As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas, sob aerobiose. Então, a leitura dos halos de inibição foi realizada com um paquímetro digital (*Mitutoyo Digimatic Caliper*, *Mitutoyo Sul Americana Ltda*, Suzano, São Paulo, Brasil).

Este teste foi realizado em duplicata (um mesmo microrganismo revelador aplicado em duas placas com o mesmo microrganismo isolado testado) com três repetições.

A comparação das médias dos halos de inibição foi submetida à análise de normalidade. Os resultados desse tipo de teste demonstraram, todavia, comportamento não normal e foi, portanto, aplicado o teste de Kruskal-Wallis para comparação das médias dos halos de inibição observados no presente teste (Sampaio, 2002).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Isolamento, enumeração, caracterização fisiológica e morfo-tintorial das bactérias ácido-lácticas isoladas de leite de ovelha**

#### **4.1.1. Isolamento e enumeração**

A contagem média de microrganismos isolados no ágar M17 (*Difco*) foi de  $9,49 \times 10^4$  UFC/mL, enquanto a dos isolados em ágar MRS (*Difco*) foi de  $3,08 \times 10^3$  UFC/mL. O ágar M17 é menos seletivo e propicia o crescimento de microrganismos ácido-lácticos de gêneros como *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, entre outros. Já o ágar MRS é mais seletivo para o crescimento de microrganismos do gênero *Lactobacillus*, devido ao pH normalmente reduzido desse tipo de meio de cultura. No entanto, isso não impede que um microrganismo de um determinado gênero consiga crescer no meio que não é mais propício ao seu crescimento. A contagem média de microrganismos isolados do leite de ovelhas Lacaune foi de  $4,6 \times 10^5$  UFC/mL, já a de isolados do leite de ovelhas mestiças ( $\frac{1}{2}$  Lacaune e  $\frac{1}{2}$  Santa Inês) foi de  $4,42 \times 10^4$  UFC/mL e a de ovelhas Santa Inês foi de  $2 \times 10$  UFC/mL. Os dados encontrados sugerem que o gênero das bactérias isoladas do leite de ovelha serão predominantemente *Enterococcus*, *Lactococcus* e/ou *Streptococcus* e que o leite de ovelhas da raça Lacaune e suas mestiças têm maior predominância de microrganismos ácido-lácticos que o de ovelhas da raça Santa Inês. A maior tradição leiteira das raças Lacaune provavelmente está associada a maior contagens de bactérias ácido-lácticas no seu leite e no leite de suas mestiças, visto que é antigo o uso do leite de ovelhas dessa raça é usado para a produção de queijos.



#### **4.1.2. Caracterização fisiológica e morfo-tintorial**

Todos os 24 (100%) morfotipos diferentes de microrganismos isolados do leite de diferentes ovelhas, tanto em ágar MRS (*Difco*) quanto em M17 (*Difco*), apresentaram-se, quando visualizados em lâmina, corados pelo método de Gram, sob microscopia ótica, como cocos Gram positivo. Oito microrganismos (33,33%) dos 24 morfotipos diferentes isolados de leite de ovelha, apresentaram-se positivos para o teste de catalase e/ou apresentaram morfologia semelhante à do gênero *Staphylococcus* (aspecto de “cacho de uva” das colônias sob microscopia óptica) e foram eliminados para os testes que se seguiram de identificação molecular e potencial probiótico.

#### **4.2. Identificação das bactérias ácido-lácticas isoladas de leite de ovelha por técnicas de biologia molecular**

##### **4.2.1. Identificação pelo método de PCR ARDRA 16S-23S**

A identificação de bactérias ácido-lácticas por métodos fenotípicos é, além de laboriosa, muitas vezes inconclusiva, requerendo do pesquisador a realização de uma bateria de testes para determinar com precisão a espécie. Por isso, os microrganismos isolados que não foram eliminados na caracterização fisiológica e morfo-tintorial, foram submetidos à identificação pela amplificação por PCR da região intergênia 16S-23S, de acordo com metodologia já elucidada. Com isso, foi determinada a presença de 16 bactérias ácido-lácticas do gênero *Enterococcus* e/ou *Lactococcus* devido à presença de dois espaçadores transcritos 1 (ITS 1) da sequência da região 16S-23S do rDNA, seja por duplicação ou inserção desta sequência dos isolados (Tannock *et al.*, 1999).

A restrição enzimática não permitiu diferenciar em nível de espécie as amostras isoladas, sendo necessário o sequenciamento destas para tal.

Na figura 1, pode ser observado os três diferentes perfis de restrição enzimática das bactérias ácido-lácticas isoladas do leite de ovelha.

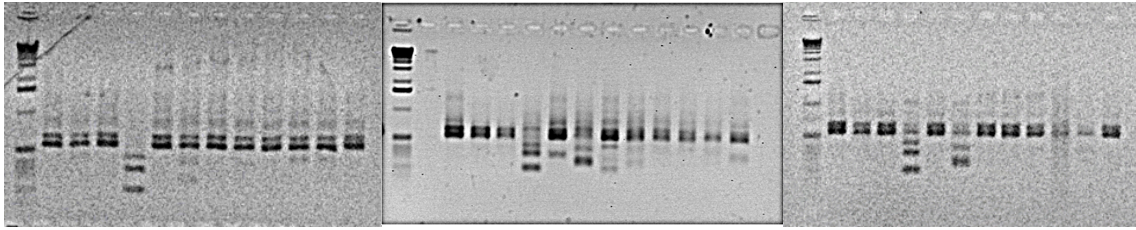


Figura 1. Perfil de restrição enzimática de microrganismos isolados de leite de ovelha obtidos por PCR-ARDRA (16S-23S) das amostras 3.1, 5 e 14.3, da esquerda para direita. Em todas as fotos, da esquerda para direita, a primeira canaleta é o *ladder* de 1 Kb seguido das 12 enzimas de restrição utilizadas, na ordem em que são apresentadas: *Sph I*, *Nco I*, *Nhe I*, *Ssp I*, *Csp 45*, *Eco RV*, *Dra I*, *Vsp I*, *Hinc II*, *Eco RI*, *Hind III*, *Avr II*.

#### 4.2.2. Identificação por sequenciamento do gene 16S rDNA

O sequenciamento do gene 16S rDNA revelou a presença de três espécies diferentes de enterococos que podem ser observadas na tabela 3.

Tabela 3. Espécies de *Enterococcus* spp. reveladas pelo sequenciamento do gene 16S rDNA pelo método de Sanger dos microrganismos isolados de leite de ovelha

Ovelha (Raça)	Amostra	Espécie
1433 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	3.1	<i>E. faecium</i>
L04 (Lacaune)	4.2	<i>E. faecium</i>
1516 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	5	<i>E. durans</i>
L09 (Lacaune)	6.2	<i>E. faecium</i>
L09 (Lacaune)	6.4	<i>E. faecium</i>
194 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	8.2	<i>E. durans</i>
1448 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	10.3	<i>E. casseliflavus</i>
81 (Santa Inês)	12.1	<i>E. faecium</i>
81 (Santa Inês)	12.2	<i>E. faecium</i>
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.1	<i>E. faecium</i>
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.3	<i>E. casseliflavus</i>
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.4	<i>E. faecium</i>
1469 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	16	<i>E. durans</i>
300 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	20.4	<i>E. durans</i>
300 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	20.5	<i>E. faecium</i>
1508 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	23	<i>E. durans</i>

Nove (56,25%) das 16 amostras de bactérias ácido-lácticas foram identificadas como *E. faecium*, cinco (31,25%) como *E. durans* e duas (12,5%) como *E. casseliflavus*.

Trabalhos que isolaram e identificaram microrganismos do leite cru de ovelha como o de Medina *et al.* (2001), que isolaram bactérias ácido-lácticas do leite de ovelha do Nordeste argentino, detectaram uma prevalência de 70% de bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* em comparação a 30% do gênero

*Lactobacillus*. O gênero *Enterococcus* representou 48% das bactérias ácido-lácticas isoladas e confirma a maior prevalência desse gênero em leite de ovelha, assim como foi observado no presente trabalho. Já no trabalho de Oksuztepe, Patir e Çalicioglu (2005), ao isolarem bactérias ácido-lácticas do leite cru de ovelhas e ao longo da maturação de um queijo feito a partir deste leite cru, os pesquisadores observaram que 22 a 33% de bactérias eram do gênero *Enterococcus* dentre todos os microrganismos isolados, porém, o gênero predominante identificado pelos autores foi *Lactobacillus* e não *Enterococcus*, diferente do observado no presente trabalho.

Trabalhos que isolaram e identificaram microrganismos de queijos feitos a partir de leite cru de ovelha, como o de Durlu-Ozkaya *et al.* (2008), que identificaram bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo *Beyaz*, por meio de métodos exclusivamente fenotípicos, observaram a predominância (62,33%) de bactérias do gênero *Enterococcus*. Dentre as espécies identificadas, a mais abundante (66,67%) foi a *E. faecium*, seguidas por *E. hirae* (20,83%) e *E. durans* (12,5%). No presente trabalho, não foram identificadas amostras de *E. hirae*, mas foram identificadas amostras de *E. casseliflavus*. A predominância de *E. faecium* também foi constatada no presente trabalho. Abdi, Sheikh-Zeinoddin e Soleimanian-Zad (2006), ao identificarem bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo *Lighvan*, por meio de métodos exclusivamente fenotípicos, observaram altos percentuais (42%) de bactérias do gênero *Enterococcus*, porém, a predominância observada foi do gênero *Lactobacillus* (46%). Todas as espécies do gênero *Enterococcus* foram identificadas como *E. faecium*. Jurkovic *et al.* (2006), também investigaram bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo tipo *Bryndza*, por meio de métodos exclusivamente fenotípicos. Esses autores identificaram enterococos das espécies *E. faecium*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. mundtii* e *E. casseliflavus*, sendo *E. faecium* a mais prevalente (57,5% dos enterococos isolados) e *E. casseliflavus*, a menos prevalente (3,6%). Esses resultados corroboram os resultados encontrados no presente trabalho quanto à maior e menor prevalência de espécies do gênero *Enterococcus* dentre os microrganismos isoladas.

#### 4.3. Sensibilidade *in vitro* dos enterococos isolados de leite de ovelha ao pH gástrico

Os resultados referentes à absorvância máxima alcançada pelos enterococos isolados de leite de ovelha em caldo MRS (*Difco*) incubadas por 15 horas a 37°C, após três horas de incubação a 37°C, em salina com pH gástrico (NaCl 0,85% com pH 2.0) podem ser observadas na tabela 4.

Tabela 4. Absorvância máxima alcançada pelas 16 amostras de *Enterococcus* spp. isoladas de leite de ovelha em 15 horas de incubação a 37°C, após três horas de incubação em pH gástrico (2.0) a 37°C

Ovelha (Raça)	Amostra (Espécie)	Absorvância máxima
81 (Santa Inês)	12.1 ( <i>E. faecium</i> )	0,987
L09 (Lacaune)	6.2 ( <i>E. faecium</i> )	0,986
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.1 ( <i>E. faecium</i> )	0,966
300 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	20.5 ( <i>E. faecium</i> )	0,945
81 (Santa Inês)	12.2 ( <i>E. faecium</i> )	0,944
300 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	20.4 ( <i>E. durans</i> )	0,933
1469 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	16 ( <i>E. durans</i> )	0,891
1516 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	5 ( <i>E. durans</i> )	0,699
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	0,493
L09 (Lacaune)	6.4 ( <i>E. faecium</i> )	0,398
1433 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	3.1 ( <i>E. faecium</i> )	0,366
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.4 ( <i>E. faecium</i> )	0,342
L04 (Lacaune)	4.2 ( <i>E. faecium</i> )	0,320
194 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	8.2 ( <i>E. durans</i> )	0,261
1448 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	10.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	0,223
1508 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	23 ( <i>E. durans</i> )	0,166

Os resultados referentes à tolerância dos enterococos isolados de leite de ovelha ao suco gástrico podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5. Percentual de inibição por pH gástrico (2.0) de 16 amostras de *Enterococcus* spp. isoladas de leite de ovelha

Ovelha (Raça)	Amostra (Espécie)	Percentual de inibição
81 (Santa Inês)	12.1 ( <i>E. faecium</i> )	0,00%
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.1 ( <i>E. faecium</i> )	0,00%
300 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	20.4 ( <i>E. durans</i> )	0,73%
300 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	20.5 ( <i>E. faecium</i> )	2,08%
81 (Santa Inês)	12.2 ( <i>E. faecium</i> )	5,65%
1469 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	16 ( <i>E. durans</i> )	7,26%
L09 (Lacaune)	6.4 ( <i>E. faecium</i> )	16,01%
L04 (Lacaune)	4.2 ( <i>E. faecium</i> )	19,74%
1433 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	3.1 ( <i>E. faecium</i> )	26,29%
1448 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	10.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	26,75%
L09 (Lacaune)	6.2 ( <i>E. faecium</i> )	31,97%
1516 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	5 ( <i>E. durans</i> )	36,00%
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	39,60%
194 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	8.2 ( <i>E. durans</i> )	42,42%
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.4 ( <i>E. faecium</i> )	57,62%
1508 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	23 ( <i>E. durans</i> )	75,28%

A capacidade de bactérias ácido-lácticas resistirem a baixos valores de pH (ou pH ácido), tal como o do estômago do ser humano (pH 2.0) e dos demais mamíferos domésticos (entre pH 2.0 e 4.0), está relacionada à habilidade dessas de bombear os prótons de H<sup>+</sup> direcionados para o interior de suas células (quando em meio com pH ácido) pela ação da enzima F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase. Porém, a ação dessa enzima está condicionada a diversos fatores intra e extracelulares que vão determinar a tolerância ou não de uma bactéria ácido-láctica ao pH ácido (Corcoran *et al.*, 2005). Gilliland, Stanley e Bush (1984), preconizaram que para uma bactéria ácido-láctica ser resistente ao ácido gástrico, essa teria que alcançar absorvância de 0,3 após duas horas de incubação em valores de pH na faixa de 1.5 a 4.0. Park *et al.* (2006), em estudo sobre a tolerância de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato gastrintestinal de diversos animais domésticos, concluiu que para ser considerada tolerante ao ácido gástrico, uma bactéria deveria resistir a pH entre 2.0 e 3.0 por um período de três horas.

No presente trabalho, optou-se também por analisar a sensibilidade ao suco gástrico pela diferença entre as áreas das curvas de crescimento do controle e da amostra após incubação em salina (NaCl 0,85%) com pH 2.0 por três horas, para comparar o crescimento com o do grupo controle e não só avaliar a absorvância alcançada pelo crescimento em caldo MRS (*Difco*) após exposição a pH ácido. Autores como Costa

(2010) e Alvim (2011), utilizaram a mesma metodologia ao avaliarem a tolerância *in vitro* a sais biliares de bactérias ácido-lácticas.

Considerando a diferença entre as curvas de crescimento e a absorbância máxima alcançada, 12 (75%) das 16 amostras de enterococos avaliadas foram consideradas tolerantes ao ácido gástrico, por apresentarem menos de 40% de inibição ao pH 2.0. Uma (6,25%) das 16 amostras de enterococos avaliadas foi considerada moderadamente tolerante (ou moderadamente sensível), por apresentar entre 40 e 80% de inibição. Três (18,75%) das 16 amostras de enterococos foram consideradas sensíveis ao pH gástrico por não terem atingido absorbância de 0,3 ao longo da incubação a 37°C por 15 horas, após incubação em salina (NaCl 0,85%) com pH 2.0.

Nas figuras 2, 3 e 4 podem ser observadas as curvas de crescimento de amostras de *Enterococcus* spp. de diferentes espécies na presença de ácidos simulando ambiente gástrico.

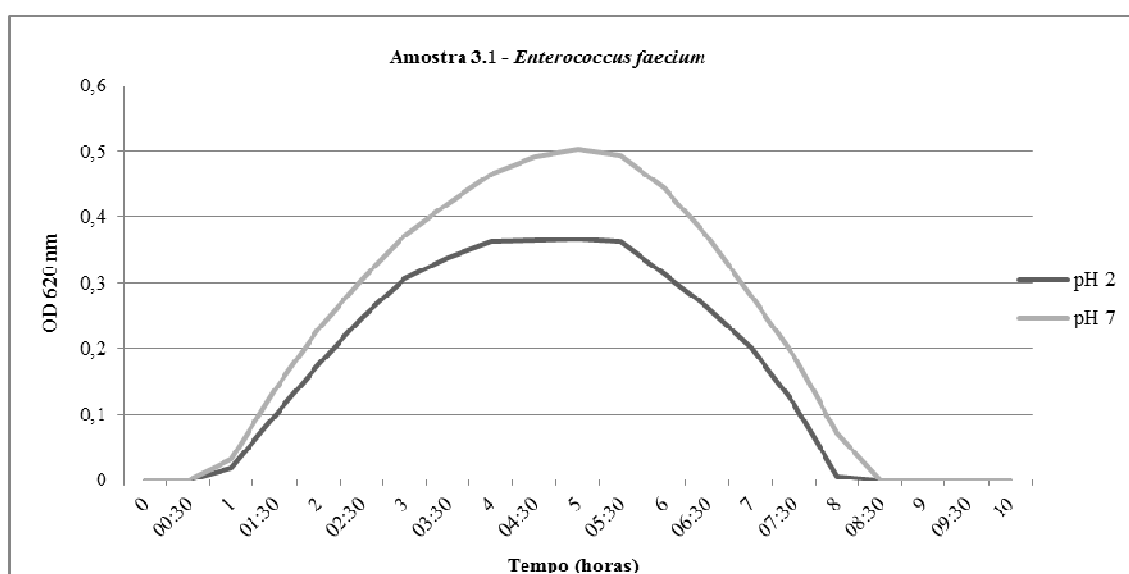


Figura 2. Curvas de crescimento da amostra 3.1 - *E. faecium* - incubada a 37°C em caldo MRS (*Difco*), após incubação em pH 2.0 por três horas e do controle (pH 7.0).

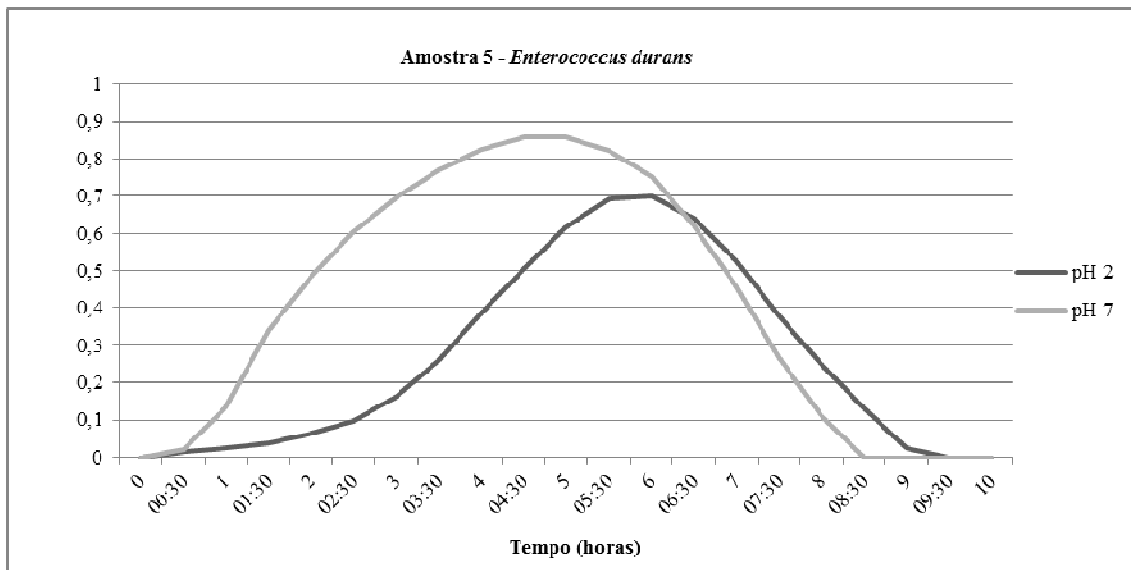


Figura 3. Curvas de crescimento da amostra 5 – *E. durans* - incubada a 37°C em caldo MRS (*Difco*), após incubação em pH 2.0 por três horas e do controle (pH 7.0).

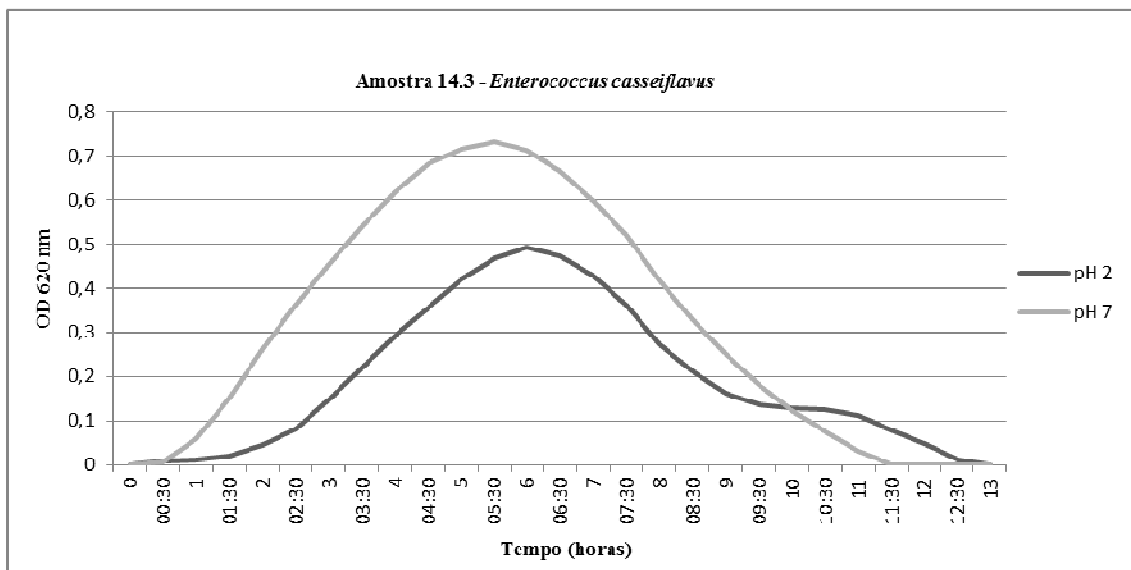


Figura 4. Curva de crescimento da amostra 14.3 – *E. casseliflavus* - incubada a 37°C em caldo MRS (*Difco*), após incubação em pH 2.0 por três horas e do controle (pH 7.0).

No trabalho de Morandi *et al.* (2005), ao avaliarem a tolerância de amostras de *E. faecium* e *E. faecalis* a diferentes valores de pH, observou-se que várias amostras de *E. faecium* foram tolerantes a valores baixos de pH, ou pH ácido, assim como as

amostras de *E. faecium* e de outras espécies do gênero *Enterococcus* do presente estudo. Redondo (2008) constatou não só tolerância a diferentes faixas de pH ácidos (entre 1.0 e 4.0) de uma amostra de *E. faecium*, como também constatou que o microrganismo testado não cessou sua multiplicação em presença de pH ácido, aumentando a absorvância analisada durante o período experimental.

Cueto-Vigil, Acuña-Monsalve e Valenzuela-Riaño (2010), ao avaliarem a sobrevivência de bactérias ácido-lácticas incubadas por duas horas em pH 2.0, observaram inibição de 56,8% para uma amostra de *E. faecium* e 38,5% para uma amostra de *E. durans*. Logo, vê-se a variabilidade das diversas amostras do gênero *Enterococcus* ao ácido gástrico e a tendência geral à tolerância a essa característica por representantes desse gênero.

#### 4.4. Sensibilidade *in vitro* dos enterococos isolados de leite de ovelha aos sais biliares

Os resultados referentes à absorvância máxima alcançada pelos enterococos isolados de leite de ovelha em caldo MRS (*Difco*) com 0,3% de *oxgall* (BD), incubados por 18 horas a 37°C, podem ser observadas na tabela 6.

Tabela 6. Absorvância máxima alcançada pelas 16 amostras de *Enterococcus* spp. isoladas de leite de ovelha em 18 horas de incubação a 37°C

Ovelha (Raça)	Amostra (Espécie)	Absorvância máxima
1433 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	3.1 ( <i>E. faecium</i> )	0,938
1516 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	5 ( <i>E. durans</i> )	0,883
194 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	8.2 ( <i>E. durans</i> )	0,843
L09 (Lacaune)	6.4 ( <i>E. faecium</i> )	0,841
1469 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	16 ( <i>E. durans</i> )	0,841
L04 (Lacaune)	4.2 ( <i>E. faecium</i> )	0,834
L09 (Lacaune)	6.2 ( <i>E. faecium</i> )	0,827
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.4 ( <i>E. faecium</i> )	0,824
1508 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	23 ( <i>E. durans</i> )	0,799
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	0,768
300 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	20.5 ( <i>E. faecium</i> )	0,576
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.1 ( <i>E. faecium</i> )	0,245
81 (Santa Inês)	12.2 ( <i>E. faecium</i> )	0,225
81 (Santa Inês)	12.1 ( <i>E. faecium</i> )	0,213
300 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	20.4 ( <i>E. durans</i> )	0,132
1448 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	10.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	0,039



Os resultados referentes à sensibilidade dos enterococos isolados de leite de ovelha aos sais biliares podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7. Percentual de inibição por sais biliares (*oxgall*, BD, 0,3%) de 16 amostras de *Enterococcus* spp. isoladas de leite de ovelha

Ovelha (Raça)	Amostra (Espécie)	Percentual de inibição (%)
1433 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	3.1 ( <i>E. faecium</i> )	23,22
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	26,68
1516 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	5 ( <i>E. durans</i> )	26,69
194 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	8.2 ( <i>E. durans</i> )	26,89
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.4 ( <i>E. faecium</i> )	27,51
L04 (Lacaune)	4.2 ( <i>E. faecium</i> )	30,14
1508 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	23 ( <i>E. durans</i> )	31,76
L09 (Lacaune)	6.2 ( <i>E. faecium</i> )	32,55
L09 (Lacaune)	6.4 ( <i>E. faecium</i> )	32,75
102 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	14.1 ( <i>E. faecium</i> )	34,14
1469 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	16 ( <i>E. durans</i> )	41,64
300 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	20.5 ( <i>E. faecium</i> )	44,27
81 (Santa Inês)	12.2 ( <i>E. faecium</i> )	58,76
81 (Santa Inês)	12.1 ( <i>E. faecium</i> )	58,76
300 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	20.4 ( <i>E. durans</i> )	63,01
1448 (½ Santa Inês, ½ Lacaune)	10.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	85,88

Os sais biliares são importantes na eliminação de bactérias patogênicas presentes no trato gastrointestinal pela sua ação detergente, capaz de solubilizar a membrana plasmática dos agentes patogênicos. Essa ação, porém, não afeta exclusivamente as bactérias patogênicas e os microrganismos probióticos precisam, portanto, ser tolerantes a esses sais biliares para que possam exercer efeitos benéficos aos seus consumidores (Ballus *et al.*, 2010). Segundo Gilliland, Stanley e Bush (1984), quando a absorvância de 0,3 é atingida por uma bactéria ácido-láctica, após oito horas de incubação em meio adicionado de 0,3% de *oxgall*, esta pode ser considerada tolerante aos sais biliares. Sumita (2007) concluiu em seu trabalho que a absorvância de 0,412 atingida por culturas de bactérias ácido-láticas, após incubação por 24 horas a 37°C, representava a tolerância dessas aos sais biliares.

No presente trabalho, optou-se por não avaliar exclusivamente a absorvância alcançada pelo crescimento em presença de sais biliares. Analisou-se também a sensibilidade a sais biliares pela diferença entre as áreas das curvas de crescimento do controle e da amostra em presença de *oxgall* (BD) 0,3%, para comparar o crescimento com o do grupo controle. Autores como Mirolohi *et al.* (2009) e Alvim

(2010) utilizaram a mesma metodologia ao avaliarem a tolerância *in vitro* a sais biliares de bactérias ácido-lácticas.

Considerando a diferença entre as curvas de crescimento e a absorbância máxima alcançada, nove (56,25%) das 16 amostras de enterococos avaliadas foram consideradas tolerantes aos sais biliares por apresentarem menos de 40% de inibição ao *oxgall* (BD) 0,3%. Duas (12,5%) das 16 amostras de enterococos avaliadas foram consideradas moderadamente tolerantes (ou moderadamente sensíveis) por apresentarem entre 40 e 80% de inibição. Uma (6,25%) amostra de *E. casseliflavus* dentre as 16 amostras avaliadas foi considerada sensível aos sais biliares por apresentar inibição maior que 80% ao *oxgall* (BD) 0,3% e por não ter atingido 0,3 de absorbância ao longo da incubação - 18 horas, a 37°C, em meio contendo 0,3% de *oxgall* (BD). Quatro (25%) das 16 amostras de enterococos também foram consideradas sensíveis aos sais biliares por não terem atingido absorbância de 0,3, totalizando cinco (31,25%) das 16 amostras de enterococos como sensíveis aos sais biliares. Costa (2010) e Alvim (2011) consideraram intervalos semelhantes para as suas bactérias ácido-lácticas avaliadas quanto à tolerância (ou sensibilidade) aos sais biliares (*oxgall* 0,3%).

Nas figuras 5, 6 e 7 podem ser observadas as curvas de crescimento de amostras de *Enterococcus* spp. de diferentes espécies na presença de sais biliares.

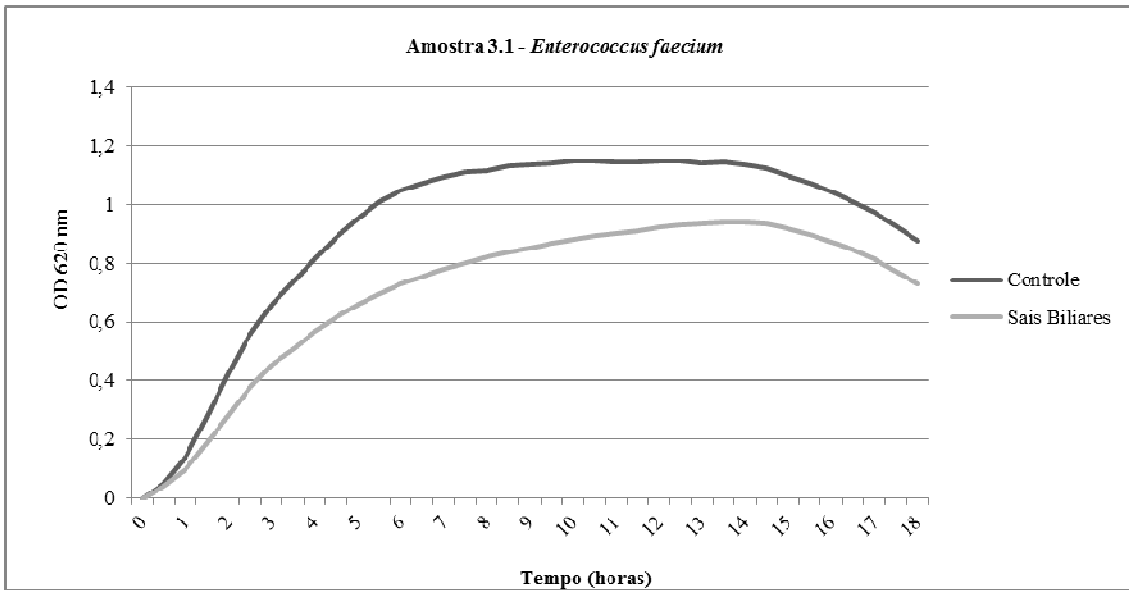


Figura 5. Curvas de crescimento da amostra 3.1 – *E. faecium* - incubada a 37°C em meio contendo *oxgall* (BD) a 0,3% e do controle.

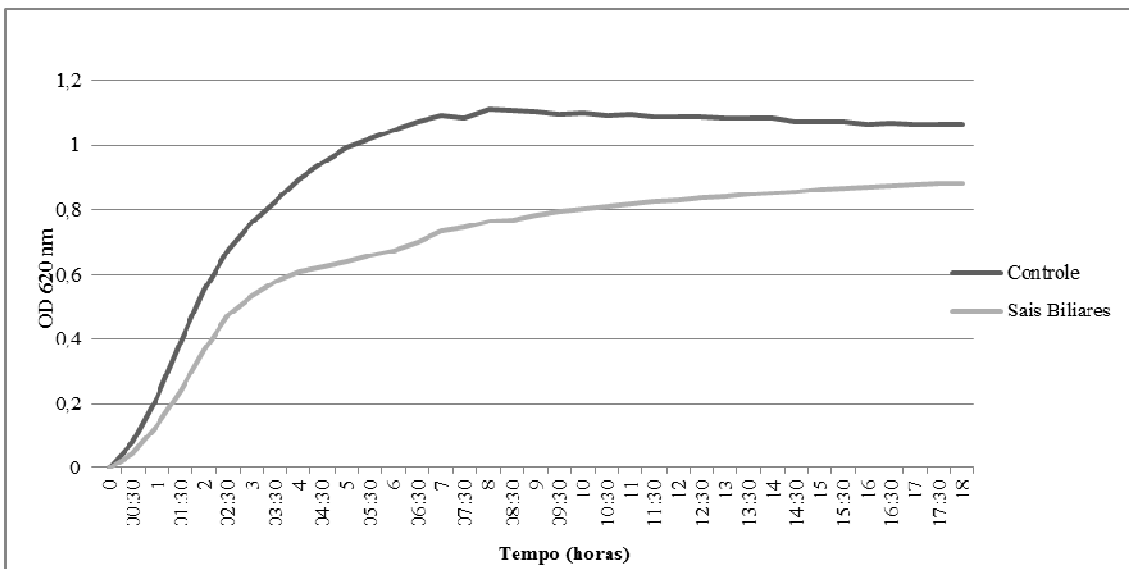


Figura 6. Curva de crescimento da amostra 5 – *E. durans* - incubada a 37°C em meio contendo *oxgall* (BD) a 0,3% e do controle.

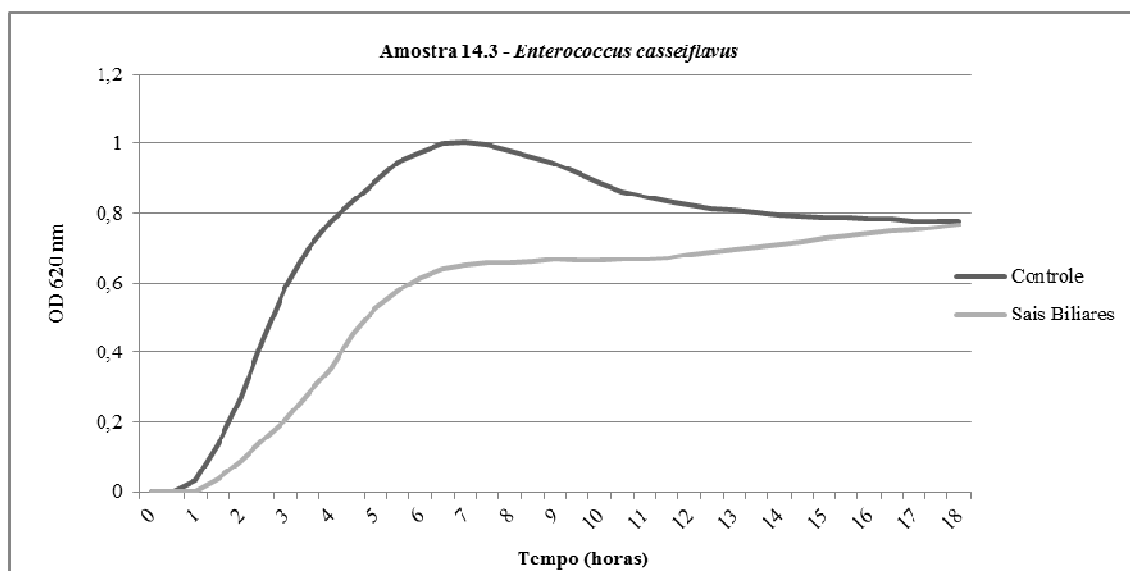


Figura 7. Curva de crescimento da amostra 14.3 – *E. casseliflavus* - incubada a 37°C em meio contendo *oxgall* (BD) a 0,3% e do controle.

Redondo (2008), ao avaliar a tolerância de uma amostra de *E. faecium* aos sais biliares (*oxgall* 0,3%) em caldo MRS, observou que a mesma atingiu a absorvância mínima desejada (0,3 a OD<sub>560nm</sub>) em um curto período de tempo (120 minutos) e a considerou tolerante, assim como boa parte das amostras de *E. faecium* do presente trabalho. Lauková *et al.* (2008), ao testarem o potencial probiótico de amostras de *E. faecium* isolados de fezes caninas, observaram a tolerância e sobrevivência a até 5% de *oxgall* de uma das amostras testadas. No trabalho de Pereira e Gibson (2002), ao avaliarem diversas bactérias ácido-lácticas quanto à tolerância aos sais biliares, submetendo as amostras a 0,4% de *oxgall* em caldo MRS por 12 horas a 37°C, constataram que a amostra de *E. durans* foi a espécie mais tolerante e que apresentou melhor crescimento na presença de sais biliares, dentre todas as espécies testadas. Já Ambadoyiannis *et al.* (2004), ao avaliarem amostras de *E. faecium* e *E. durans* isoladas de queijo *Feta* (feito a partir de leite de vaca, cabra e ovelha) e fezes de crianças, observaram tolerância dessas espécies a até 1% de *oxgall*.

#### 4.5. Susceptibilidade *in vitro* dos enterococos isolados do leite de ovelha aos antimicrobianos

Os resultados referentes aos antibiogramas de 16 amostras de enterococos isolados de leite de ovelha podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos (diâmetro do halo de inibição em milímetros) de 16 amostras de *Enterococcus* spp. isolados de leite de ovelha

Amostra	Antimicrobiano									
	CAZ	CIP	DA	E	CN	OX	P	S	TE	VA
3.1 ( <i>E. faecium</i> )	11,49 R	0,00 R	31,17 S	25,58 S	11,31 R	10,99 R	21,27 S	0,00 R	19,99 S	0,00 R
4.2 ( <i>E. faecium</i> )	0,00 R	0,00 R	32,22 S	28,08 S	12,67 R	8,08 R	22,85 S	0,00 R	20,35 S	0,00 R
5 ( <i>E. durans</i> )	0,00 R	0,00 R	33,16 S	27,63 S	10,82 R	7,47 R	23,85 S	0,00 R	21,30 S	0,00 R
6.2 ( <i>E. faecium</i> )	7,98 R	0,00 R	32,07 S	26,47 S	11,21 R	8,73 R	22,11 S	0,00 R	21,34 S	0,00 R
6.4 ( <i>E. faecium</i> )	0,00 R	0,00 R	32,03 S	30,18 S	12,56 R	0,00 R	22,35 S	0,00 R	24,69 S	0,00 R
8.2 ( <i>E. durans</i> )	8,58 R	0,00 R	29,77 S	24,51 S	11,85 R	9,03 R	21,96 S	0,00 R	19,59 S	0,00 R
10.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	7,81 R	0,00 R	29,73 S	26,89 S	12,47 R	8,87 R	23,08 S	0,00 R	19,65 S	0,00 R
12.1 ( <i>E. faecium</i> )	0,00 R	15,86 MS	9,70 MS	26,51 S	10,73 R	10,09 R	15,23 S	0,00 R	0,00 R	18,49 S
12.2 ( <i>E. faecium</i> )	0,00 R	0,00 R	13,64 S	25,79 S	11,72 R	10,50 R	22,36 S	0,00 R	19,36 S	0,00 R
14.1 ( <i>E. faecium</i> )	0,00 R	16,81 MS	26,52 S	26,66 S	10,59 R	13,17 R	16,14 S	0,00 R	11,60 R	17,86 S
14.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	8,61 R	0,00 R	32,24 S	27,20 S	12,04 R	8,03 R	25,26 S	0,00 R	20,58 S	0,00 R
14.4 ( <i>E. faecium</i> )	0,00 R	0,00 R	32,42 S	27,27 S	13,05 S	14,18 R	23,41 S	0,00 R	19,02 S	0,00 R
16 ( <i>E. durans</i> )	0,00 R	0,00 R	30,47 S	26,75 S	9,83 R	13,05 R	23,08 S	0,00 R	20,77 S	0,00 R
20.4 ( <i>E. durans</i> )	7,80 R	8,96 R	21,28 S	25,43 S	10,85 R	9,92 R	20,31 S	0,00 R	16,22 MS	0,00 R
20.5 ( <i>E. faecium</i> )	0,00 R	0,00 R	35,41 S	28,82 S	13,51 S	0,00 R	19,88 S	0,00 R	22,31 S	0,00 R
23 ( <i>E. durans</i> )	0,00 R	0,00 R	33,03 S	24,47 S	12,14 R	14,40 R	22,35 S	0,00 R	21,39 S	0,00 R

Legenda: CAZ (ceftazidima, 30 µg), CIP (ciprofloxacina, 5 µg), DA (clindamicina, 2 µg), E (eritromicina, 15 µg), CN (gentamicina, 10 µg), OX (oxacilina, 1µg), P (penicilina, 10 UI), S (estreptomicina, 10 µg), TE (tetraciclina, 30 µg), VA (vancomicina, 30 µg). R = resistente, MS = moderadamente sensível, S = sensível.

A resistência a múltiplos antimicrobianos de bactérias ácido-lácticas isoladas de alimentos de origem animal é cada vez mais notada na literatura científica. Existe uma

grande preocupação no que diz respeito à aquisição de resistência não intrínseca a certos antimicrobianos por essas bactérias e principalmente com relação à transmissão dessa resistência a microrganismos patogênicos (Lund e Edlund, 2001). Porém, em estudo de Mannu *et al.* (2003), foram comparados os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos de *E. faecium* isolados de leite cru de ovelhas com o perfil de *E. faecium* isolados de fezes das ovelhas das quais o leite era utilizado para elaboração do queijo e com *E. faecium* isolados de fezes humanas. Tal estudo mostrou que o perfil de susceptibilidade das amostras de leite cru não apresentavam resistência a grupos relevantes de antimicrobianos usados em tratamentos clínicos humanos, indicando que, ao menos na região da Itália, onde a investigação foi realizada, não houve correlação entre a resistência a antimicrobianos de *E. faecium* isolados de fezes humanas e *E. faecium* isolados de leite cru de ovelhas.

Todas as amostras de enterococos testadas apresentaram resistência à ceftazidima, oxacilina e estreptomicina dentro das condições experimentais utilizadas. Duas (12,5%) amostras de *E. faecium* (12.1 e 14.1) das 16 amostras de enterococos avaliadas apresentaram moderada sensibilidade ao ciprofloxacino, enquanto todas as outras 14 (87,5%) amostras apresentaram resistência. Situação semelhante ocorreu para a vancomicina, pois as mesmas amostras apresentaram sensibilidade à esse antimicrobiano, enquanto todas as outras amostras apresentaram resistência. Duas (12,5%) amostras de *E. faecium* (14.4 e 20.5) apresentaram sensibilidade à gentamicina, enquanto as outras 14 (87,5%) amostras testadas apresentaram resistência. Para tetraciclina, 13 (81,25%) amostras apresentaram sensibilidade, uma (6,25%) amostra de *E. durans* apresentou moderada sensibilidade e duas (12,5%) amostras apresentaram resistência dentro das 16 amostras de enterococos avaliadas. É curioso notar que as duas amostras resistentes à tetraciclina foram justamente as únicas amostras de *E. faecium* (12.1 e 14.1) que apresentaram moderada ou total sensibilidade ao ciprofloxacino e à vancomicina. Todas as amostras de enterococos testadas apresentaram sensibilidade à clindamicina, eritromicina e penicilina dentro das condições experimentais do presente trabalho.

Coque *et al.* (1996), ao analisarem o perfil de susceptibilidade de *E. faecium* de várias fontes a antimicrobianos, perceberam a resistência das amostras a clindamicina,

ciprofloxacina, tetraciclina e vancomicina, diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, no qual a sensibilidade à clindamicina e tetraciclina foi observada na maioria das amostras avaliadas. Isso se dá, provavelmente pelo fato de as amostras de enterococos do presente trabalho serem oriundas do leite de ovelhas de uma pequena propriedade rural, com reduzido uso de terapias com antimicrobianos. Todavia, no trabalho de Coque *et al.* (1996), não foram observadas amostras conhecidamente probióticas com resistência à vancomicina, fato observado no presente trabalho apenas em duas das 16 amostras avaliadas.

Vankerckhoven *et al.* (2008), avaliando amostras de *E. faecium* de várias fontes, observaram a maior taxa de resistência à eritromicina das amostras estudadas, o que é contrário ao resultado encontrado neste trabalho, pois todas as amostras de enterococos testadas apresentaram sensibilidade à eritromicina.

Bulajic e Mijacevic (2004) constataram maior resistência de amostras de enterococos isoladas de queijo à penicilina e tetraciclina, e maior sensibilidade à gentamicina e eritromicina dentre as amostras estudadas. Os resultados contradizem os dados do presente trabalho, em parte, visto que neste foi encontrada alta sensibilidade à penicilina, tetraciclina e eritromicina e alta resistência à gentamicina. A diferença pode estar na resistência das amostras presentes no queijo, veiculadas pelos manipuladores deste, ao contrário do leite de ovelha do presente trabalho, que tem menor manipulação que um queijo, mesmo que este seja obtido de um sistema de ordenha manual.

No estudo de Marcináková, Simonová e Lauková (2004) foi observada a sensibilidade a eritromicina, tetraciclina e vancomicina em *E. faecium* isolados de silagem, podendo indicar que a origem das amostras de *E. faecium* do presente estudo possa ter sofrido alguma influência do tipo de nutrição das ovelhas das quais do leite cru foram isolados os microrganismos.

Cueto-Vigil, Acuña-Monsalve e Valenzuela-Riaño (2010) encontraram em seu estudo *E. durans* e *E. faecium*, isolados de produto lácteo típico da Colômbia denominado “suero costeño” - uma espécie de coalhada salgada - sensíveis à clindamicina,

tetraciclina, eritromicina e penicilina, assim como a maioria das amostras de mesma espécie do presente estudo. A sensibilidade de enterococos à clindamicina, constatada no estudo mencionado e no presente estudo, é dada como intrínseca pela ANVISA (2005), de acordo com seu 15º Suplemento Informativo.

Segundo Mannu *et al.* (2003), ao compararem o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *E. faecium* isoladas de leite cru de ovelha e fezes das mesmas ovelhas, observaram que os microrganismos isolados do leite cru apresentaram sensibilidade a penicilina, tetraciclina e vancomicina, enquanto aqueles isolados das fezes apresentaram resistência à penicilina, moderada resistência à tetraciclina e sensibilidade à vancomicina. Esses dados reforçam que as amostras de enterococos do presente trabalho são oriundas do leite cru de ovelhas, pois foram sensíveis a penicilina e tetraciclina (como pode ser observado na tabela 8), e não de possíveis contaminações pelas fezes das ovelhas, apesar de que houve a diferença entre o perfil de susceptibilidade à vancomicina entre os dois trabalhos.

#### **4.6. Antagonismo *in vitro* entre amostras de enterococos isolados de leite de ovelha e contra microrganismos indicadores**

Os resultados referentes ao teste de antagonismo *in vitro* de dez amostras de enterococos isoladas do leite de ovelha contra microrganismos patógenos de referência e contra uma espécie de *Enterococcus durans*, isolada também do leite de ovelha, podem ser observados na tabela 9.



Tabela 9. Média dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo *in vitro* dos *Enterococcus* spp. isolados do leite de ovelha contra microrganismos indicadores

Amostra	Reveladoras						
	EC	LM	EF	SA	ST	PA	23 (20.4)
3.1 ( <i>E. faecium</i> )	68,88	56,82	9,06	16,45	0,00	0,00	0,00
4.2 ( <i>E. faecium</i> )	72,26	77,95	34,14	30,28	0,00	0,00	0,00
5 ( <i>E. durans</i> )	69,98	80,85	46,02	17,37	0,00	0,00	0,00
6.2 ( <i>E. faecium</i> )	56,33	52,72	35,04	33,14	15,71	0,00	0,00
6.4 ( <i>E. faecium</i> )	66,63	69,91	0,00	17,46	0,00	0,00	0,00
12.1 ( <i>E. faecium</i> )	71,44	54,96	29,86	24,99	0,00	0,00	0,00
14.1 ( <i>E. faecium</i> )	71,59	21,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	52,00	77,79	44,67	18,04	0,00	0,00	0,00
14.4 ( <i>E. faecium</i> )	68,74	39,62	28,49	16,78	13,13	0,00	0,00
23 ( <i>E. durans</i> )	58,17	46,17	13,79	20,26	9,69	0,00	0,00

Legenda: EC - *Escherichia coli* ATCC 25922, LM - *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, EF - *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, SA - *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, PA - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28853, ST - *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium ATCC 1402, 23 (20.4) - *Enterococcus durans* isolados do leite de ovelha do presente trabalho.

A distribuição dos valores das atividades antagonistas foi considerada não-paramétrica e a comparação entre médias foi realizada de acordo com teste de Kruskal-Wallis.

A seleção dos dez microrganismos testados foi feita de acordo com os melhores resultados nos testes de sensibilidade a sais biliares e pH gástrico e susceptibilidade a antimicrobianos. Dessa forma, as amostras 3.1, 4.2, 5, 6.2, 6.4 e 14.3 foram selecionadas por apresentarem os melhores resultados em todos os testes mencionados; as amostras 12.1, 14.1 e 14.4 foram selecionadas por apresentarem um perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos diferenciado e a amostra 23 foi selecionada para avaliar se, sendo uma amostra reveladora, não possuía comportamento antagonista diferente dos outros microrganismos testados.

Tabela 10. Média (mm) dos halos de inibição dos *Enterococcus* spp. isolados de leite de ovelha para cada microrganismo indicador

<b>Microrganismo de Referência</b>	<b>Média (mm)</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Coefficiente de Variação (%)</b>
<i>E. coli</i>	65,60 <sup>a</sup>	6,94	10,57
<i>L. monocytogenes</i>	57,87 <sup>a</sup>	18,08	31,24
<i>E. faecalis</i>	24,11 <sup>b</sup>	16,34	67,79
<i>S. aureus</i>	19,48 <sup>b</sup>	8,61	44,19
<i>S. enterica</i> var. Typhimurium	3,85 <sup>c</sup>	6,04	156,72
<i>P. aeruginosa</i>	0,00 <sup>c</sup>	0,00	0,00
<b>23 (20.4)</b>	0,00 <sup>c</sup>	0,00	0,00

Legenda: Médias seguidas por letras distintas indicam resultados estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Como pode ser observado na tabela 10, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), as inibições no teste de antagonismo *in vitro* pelos enterococos isolados de leite de ovelha contra os microrganismos indicadores *E. coli* e *L. monocytogenes* foram estatisticamente superiores à inibição sobre os demais microrganismos, indicando a maior capacidade desses enterococos em inibir *in vitro* esses dois microrganismos. Já as inibições contra os microrganismos reveladores *E. faecalis* e *S. aureus* foram estatisticamente superiores à inibição contra os microrganismos indicadores *P. aeruginosa*, *S. enterica* var. Typhimurium e *E. durans* (amostra 23 ou 20.4). É interessante observar que dos microrganismos indicadores patogênicos (*E. coli*, *S. aureus*, *S. enterica* var. Typhimurium, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*) testados, somente *S. enterica* var. Typhimurium não foi inibida pelos enterococos isolados de leite de ovelha. Além disso, houve inibição contra o microrganismo indicador do gênero *Enterococcus* patogênico, da espécie *E. faecalis*, enquanto não houve inibição contra o microrganismo indicador do mesmo gênero, porém isolado do leite de ovelha (amostra 23 ou 20.4 de *E. durans*). Os maiores coeficientes de variação observados para *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *S. aureus* evidenciam o comportamento variado dos enterococos do presente trabalho frente aos microrganismos indicadores em questão.

As bacteriocinas produzidas pelos microrganismos do gênero *Enterococcus*, como enterocina A, enterocina B, enterocina P, bacteriocina AS-48, entre outras, são, entre outros fatores, responsáveis pela inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes*, principalmente, e também do crescimento de *Staphylococcus aureus*. Essa ação pode ser observada em derivados lácteos, nos quais bactérias do gênero *Enterococcus* são adicionadas à cultura iniciadora ou mesmo ao final da produção do derivado lácteo, a fim de inibir o crescimento das bactérias patogênicas mencionadas no produto ao longo da sua vida de prateleira (Giraffa, 1995). Amostras de *E. faecium* WHE 81 e FAIR-E 198, quando avaliadas em queijo quanto à sua ação contra os microrganismos patogênicos de referência (*S. aureus* e *L. monocytogenes*), comprovaram a ação inibitória das bacteriocinas produzidas pelas amostras em questão (Ennahar *et al.*, 2001; Sarantinopoulos, Kalantzopoulo e Tsakalidou, 2002). Uma amostra de *E. casseliflavus* IM416K1, isolada por Sabia *et al.* (2001) de um embutido italiano, apresentou forte inibição contra a amostra de *L. monocytogenes* testada. Os resultados do presente trabalho confirmam o encontrado nos trabalhos mencionados, pois todos os enterococos inibiram fortemente *L. monocytogenes*, nas condições de antagonismo *in vitro* do experimento, e também, ainda que com menor intensidade, *S. aureus*. Cabe ressaltar que, no presente trabalho, somente a amostra 14.4 de *E. faecium* não inibiu em nenhum grau o *S. aureus*, no teste *in vitro* de antagonismo realizado.

A amostra de *E. faecium* do trabalho de Redondo (2008) não apresentou atividade inibitória sobre amostras de *L. monocytogenes* e *E. coli*, ao contrário do observado no presente trabalho, no qual todas as amostras de enterococos testadas apresentaram inibição contra as amostras de *L. monocytogenes* e *E. coli* utilizadas. Os resultados para inibição de *S. enterica* var. Typhimurium do presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por Redondo (2008). No trabalho de Jin, Marquardt e Zhao (2000), foi observada a inibição de uma amostra de *E. coli* (K88) por uma amostra de *E. faecium* (18C23) em um teste que mensurava a capacidade de adesão da amostra patogênica às células intestinais.

Taras *et al.* (2006), ao realizarem estudo *in vivo* da ação de *E. faecium* probiótico em leitões, sobre diarreias causadas por *E. coli*, observaram a redução de amostras

patogênicas de *E. coli* nas fezes dos leitões que receberam probióticos, assim como a redução na frequência de diarreias. Em trabalho semelhante de Stropfová *et al.* (2006), leitões que receberam amostra probiótica de *E. faecium* apresentaram menores contagens de *E. coli* nas fezes que leitões do grupo controle, ao longo do experimento de sete dias de duração. A inibição *in vitro*, observada no presente trabalho, de todas as amostras de enterococos estudadas sobre *E. coli*, confirmam o potencial inibidor dos enterococos sobre esse microrganismo.

Psoni *et al.* (2006), ao avaliarem o potencial probiótico de amostras de *E. durans* isoladas de queijo *Batzos*, feito a partir do leite cru de cabra, observaram atividade antagonista *in vitro* contra amostras de *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* de referência, corroborando os resultados encontrados no presente trabalho para as amostras de *E. durans* aqui testadas.

Tabela 11. Média (mm) dos halos de inibição de cada amostra de *Enterococcus* spp. isolada do leite de ovelha frente aos microrganismos indicadores

Amostra	Média (mm)	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
4.2 ( <i>E. faecium</i> )	30,66	33,63	134,43
5 ( <i>E. durans</i> )	30,60	34,87	113,96
6.2 ( <i>E. faecium</i> )	27,56	23,12	83,88
14.3 ( <i>E. casseliflavus</i> )	27,50	31,04	112,89
12.1 ( <i>E. faecium</i> )	25,89	28,71	110,89
14.4 ( <i>E. faecium</i> )	23,82	24,45	102,65
6.4 ( <i>E. faecium</i> )	22,00	32,26	146,63
3.1 ( <i>E. faecium</i> )	21,60	29,04	109,79
23 ( <i>E. durans</i> )	21,15	22,65	107,06
14.1 ( <i>E. faecium</i> )	13,36	26,95	201,66

Não houve diferença estatística, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), entre as médias dos halos de inibição contra microrganismos de referência dos enterococos isolados de leite de ovelha testados. Isso demonstra que o comportamento das espécies de *Enterococcus* spp. frente aos microrganismos indicadores, sejam eles patogênicos, deteriorantes (como *P. aeruginosa*) ou isolados do leite de ovelha, foi semelhante e não apresentou nenhuma variação estatisticamente relevante. Os elevados coeficientes de variação observados na tabela 11 evidenciam as variações no comportamento dos *Enterococcus* spp. no presente trabalho frente a diferentes microrganismos indicadores.

#### **4.7. Seleção dos enterococos com potencial probiótico isolados do leite de ovelha**

As amostras 3.1, 4.2, 6.2 e 6.4 de *E. faecium*; 5 de *E. durans* e 14.3 de *E. casseliflavus* foram as que apresentaram o melhor potencial probiótico, baseando-se nos resultados do teste *in vitro* de sensibilidade ao pH gástrico (2.0), de sensibilidade aos sais biliares (0,3% de *oxgall*), de susceptibilidade aos antimicrobianos e do teste de antagonismo *in vitro* entre amostras de enterococos isolados de leite de ovelha e contra microrganismos indicadores. As amostras 12.1 e 14.1 de *E. faecium* foram as únicas que apresentaram sensibilidade à vancomicina, enquanto as amostras com melhor potencial probiótico citadas não demonstraram sensibilidade e sim resistência à esse antimicrobiano. Portanto, são necessários mais estudos sobre a capacidade de transmitir os genes de resistência pelas amostras selecionadas no presente trabalho a outros *Enterococcus* spp. patogênicos. O estudo de Lund e Edlund (2001) indicou a capacidade de transmissão de genes de resistência de amostras patogênicas de *E. faecalis* ou *E. faecium* a *E. faecium* de culturas iniciadoras ou probióticas. Esses autores, porém, não conseguiram provar a transmissão inversa, ou seja, de amostras probióticas ou de culturas iniciadoras para amostras patogênicas. Já no estudo de Eaton e Gasson (2001), não foi possível provar nem a transferência de genes de resistência a antimicrobianos de amostras patogênicas de *Enterococcus* spp. a amostras de *E. faecium* de culturas iniciadoras.

Outra preocupação está relacionada à virulência de microrganismos do gênero *Enterococcus* e, por isso, são necessários estudos que avaliem a presença ou não de fatores de virulência nas amostras com potencial probiótico do presente estudo. No trabalho de Eaton e Gasson (2001), assim como nos trabalhos de Franz *et al.* (2003) e de Kayser (2003), foi observada uma prevalência muito maior de genes contendo fatores de virulência em amostras de *E. faecalis* do que em amostras *E. faecium*, sejam elas isoladas de produtos de origem animal ou amostras clínicas. Já no trabalho de Carlos (2008), ao analisar a expressão de genes de virulência em *E. faecalis* e *E. casseliflavus* de origem clínica e alimentar, constatou-se que houve maior expressão destes genes em amostras de origem clínica e que essa expressão está associada à origem da amostra e não à espécie.

As amostras com melhor potencial probiótico vieram igualmente de ovelhas da raça Lacaune (três das seis amostras, ou, 50%) como de ovelhas mestiças (outras três das seis amostras, ou, 50%) de Lacaune com Santa Inês, mostrando uma relação positiva da genética da raça Lacaune, selecionada para produção leiteira, no desenvolvimento do potencial probiótico das bactérias ácido-lácticas isoladas do seu leite. Porém, as ovelhas mestiças apresentaram maior variabilidade de espécies com potencial probiótico (*E. faecium*, *E. durans* e *E. casseliflavus*) em seus leites que as ovelhas da raça Lacaune, que apresentaram somente espécies de *E. faecium* com potencial probiótico em seus leites.

## 5. CONCLUSÕES

Foi observada a predominância do gênero *Enterococcus* no leite de ovelha das raças Lacaune, Santa Inês e suas mestiças. Dentre as espécies do gênero, foi observada a predominância das espécies de *E. faecium*, *E. durans* e *E. casseliflavus*. Nenhuma bactéria ácido-láctica dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* ou *Streptococcus* foram identificadas.

Amostras do gênero *Enterococcus* isolados de leite de ovelha das raças Lacaune, Santa Inês e suas mestiças apresentaram potencial probiótico, quando testadas *in vitro*, quanto à sua tolerância ao suco gástrico e sais biliares artificiais, sensibilidade a

antimicrobianos e antagonismo contra microrganismos indicadores de referência e isolados do leite de ovelha.

As amostras 3.1, 4.2, 6.2 e 6.4 de *E. faecium*; 5 de *E. durans* e 14.3 de *E. casseliflavus* apresentaram o melhor potencial probiótico dentre todos os microrganismos isolados avaliados no presente trabalho.

São necessários mais estudos para descobrir a presença e capacidade de transmissão de genes de virulência e de resistência a antimicrobianos (principalmente os genes relacionados à resistência à vancomicina) nos enterococos isolados do leite de ovelha. Também são necessários estudos para testar o pleno potencial probiótico, *in vitro* e *in vivo*, das amostras de *E. faecium*, *E. durans* e *E. casseliflavus* identificadas e estudadas no presente trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABDI, R.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 9, n. 1, p. 99-103, 2006.

ALVIM, L. B. *Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos*. 2011. 76f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AMBADOYIANNISA, G.; HATZIKAMARIA, M.; LITOPOULOU-TZANETAKIA, E.; TZANETAKISA, N. Probiotic and technological properties of Enterococci isolates from infants and cheese. *Food Biotechnology*, v.18, n.3, p. 307-325, 2004.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, v.3, n.2, p.145-154, 2004.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo*, v. 25, n. 1, p. 55-58, 2005.

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

ARAÚJO, E. A. *Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 e de Inulina*. 2007. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ARRANS, J.; GABIÑA, D.; LÓPEZ-FRANCOS, L. Producción y Calidad de la Leche de Ovejas F1 Lacaune x Churra y Churras, exploradas en tierra de campos (Palencia). *Información Técnica Económica Agraria*, 1993. v. extra, n.12, p.27-29.

BADARÓ, A. C. L.; GUTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V.; STRINGHETA, P. C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana – parte 1. *Nutrir gerais*, v.2, n.3, p. 1-29, 2008.

BALLUS, C. A.; KLAJN, V. M.; CUNHA, M. F.; OLIVEIRA, M. L.; FIORENTINI, A. M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.28, n.1, p. 85-96, 2010.

BIANCO, A. L. *A Construção da Alegação de Saúde para Alimentos Funcionais*. Brasília: Embrapa. v. 28, 113 p. 2008.

BJOKROTH, K. J.; SHCILLINGER, U.; GEISEN, R.; WEISS, N.; HOSTE, B., HOLZAPFEL, W. H.; KORKEALA, H. J.; VANDAMME, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.52, p.141-148, 2002.

BLANCO, M. A.; GUTIERREZ, O. C.; FUENTES, V. O. Milk production of crossbreed Mexican ewes after parturition under an intensive production unit on the highlands of Mexico. An informative note. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. v. 5, n. 10, p. 844-846, 2006.

BORGES, I.; GONÇALVES, L. C. *Manual Prático de Caprino e Ovinocultura*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 190p.

BOTELHO, L. *Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro*. 2005. 101f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal de Campinas, Campinas.

BULAJIC, S.; MIJACEVIC, Z. *Enterococci* in cheese – phenotypization and antibiotic resistance. *Acta Agriculturae Slovenica*, v.84, n.1, p. 25-30, 2004.

CARLOS, A. R. C. M. *Análise da expressão génica em estirpes de Enterococcus como resposta a diferentes condições ambientais*. 2008. 18f. Dissertação (Mestrado em



Biologia Molecular e Genética) – Faculdade de Ciência, Universidade de Lisboa, Lisboa.

CHARTERIS, A. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.

COQUE, M. T.; TOMAYKO, J. F.; RICKE, S. C.; OKHYUSEN, P. C.; MURRAY, B. E. Vancomycin-resistant *Enterococci* from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.40, n.11, p. 2605-2609, 1996.

CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. R.; ROSS, R. P. Survival of probiotic Lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugar. *Applied and Environmental Microbiology*, v,71, n.6, p. 3060-3067, 2005.

CORREA, 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.

COSTA, H. H. S. *Potencial probiótico de Lactobacillus spp. e Weisella paramesenteroides isolados de queijo minas artesanal da serra da canastra- MG.* 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; VAN DENER, A. G. F. Packaging system and probiotics dairy foods. *Food Research International*, v.40, n.8, p. 951-956, 2007.

CUETO-VIGIL, M. C.; ACUÑA-MONSALVE, Y.; VALENZUELA-RIAÑO, J. Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas suero costeño. *Actualidades Biológicas*, v.32, n.93, 2010.

DEVENDRA, C.; COOP, I.E. *Ecology and Distribution*. New York: Elsevier Scientific Publishing Company. v. 1, p. 1-14. 1982.

DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 5, p. 861-870, 2008.

EATON, T.J.; GASSON, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

ENNAHAR, S.; ASOU, Y.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *International Journal of Food Microbiology*, v. 70, n. 3, p. 291-301, 2001.

FAN, Y.; CHEN, S.; YU, Y.; SI, J.; LIU, B. A probiotic treatment containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus* improves IBS symptoms in an open label trial. *Journal of Zhejiang University Science B*, v.7, n.2, p.987-991, 2006.

FAO. *Small Ruminant AGA Livestock Atlas Series*. 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aqainfo/programmes/documents/livat12/SmallR.htm>>. Acesso em: 05 abr. 2011.

FAO. *GeoNetwork Global Sheep Density*. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/geonetwork/srv/en/metadata.show?id=12716&currTab=simple>>. Acesso em: 05 abr. 2011.

FAO/OMS. *Understanding the Codex Alimentarius*. 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/>>. Acesso em: 05. abr. 2011.

FRANZ, C. M., HOLZAPFEL, W. H., STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, v.47, p. 1-24, 1999.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHELEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, v. 88, n. 2, p. 105-122, 2003.

FRASER, A.; STAMP, J. T. *Ganado ovino: production y enfermedades*. Madri: Mundi-Prensa, 1989, 385p.

GARCIA, G. R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MEDEIROS, A. A.; POIATTI, M. L.; RAGAZANI, A. V. F.; HATAYDE, M. C.; CHIODA, T. P.; COAN, R. M.; PIGATTO, C. P.; TROVÓ, K. V. P. Inibição do crescimento de bactérias patogênicas por *Lactobacillus acidophilus*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.101, n.559-560, p.263-268, 2006.

GILL, H. S.; RUTHERFURD, K. J.; CROSS, M. L.; GOPAL, P. K. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.74, p.833-839, 2001.

GILLILAND, S. E.; STANLEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 12, p. 3045-3051, 1984.

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins - their potential as anti-*Listeria* factors in dairy-technology. *Food Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 291-299, 1995.

GOMES, A. M. P; MACALTA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Biotecnologia Alimentar*. Boletim de Tecnologia, v.101, p.12-22, 2002.

GOOTWINE, E. B.; GOOT, H. Lamb and Milk Production of Awassi and East-Friesian sheep and their crosses under Mediterranean environment. *Small Ruminant Research*, v. 20, p. 255-260, 1996.

- HAENLEIN, G. F. W. *The Nutritional value of Sheep Milk*. 2005. Disponível em: <<http://www.smallstock.info/issues/sheepmilk.htm>>. Acesso em: 04 nov. 2009.
- HASLER, C. M. The changing face of functional foods. *Journal of the American College of Nutrition*, v.19, n.5, p. 499-506, 2000.
- HEASMAN, M.; MELLENTIN, J. *The functional food revolution: healthy people, healthy profits*. London: Earthscan. 2001. 313p.
- HLIVAK, P.; ODRASKA, J.; FERENCIK, M.; EBRINGER, L.; JAHNOVA, E.; MIKES, Z. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases cholesterol levels. *Bratislava Medical Journal*, v.106, n.2, p.67-72, 2005.
- HOZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. *Food Research International*, v.35, n.2/3, p.109-116, 2002.
- IBGE. *Série PPM01 – Efetivos dos rebanhos por tipo de rebanho*. 2009. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=PPM01&t=efetivo-dos-rebanhos-por-tipo-de-rebanho>>. Acesso em: 10 mai. 2011.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. *Best Practice Research Clinical Gastroenterology*, v.18, n.2, p.299-313, 2004.
- JIN, L. Z.; MARQUARDT, R. R.; ZHAO, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p.4200-4204, 2000.
- JURKOVIC, D.; KRIZKOVÁ, L.; DUSINSKÝ, R.; BELICOVÁ, A.; SOJKA, M.; KRAJKOVIC, J.; EBRINGER, L. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Letters in Applied Microbiology*, v. 42, p. 553-559, 2006.
- KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmacy Science*, v. 15, p. 1-9, 2002.
- KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*. V. 88, n. 2, p. 255-262, 2003.
- KING, J.W.B. Directory of Current Research on Sheep and Goats. *Commonwealth Agricultural Bureaux International Publ.*, 271 p., 1998.
- KLAENHAMMER, T. R.; KULLEN, M. J. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, v.50, p. 45-57, 1999.
- KREMER, R.; BARBATO, G.; ROSÉS, L.; Producción de leche y lana en ovejas Corriedale x Milchschaaf x Corriedale. In: *Encuentro de la Asociación Uruguaya de Producción Animal*, 16, 2000, Montevideo. *Anais...* Montevideo: Asociación Uruguaya de Producción Animal, 2000. 5p.

LANA, M. P.; LASARTE, J.M. Influencia de la raza en producción y calidad de leche. In: *Jornada Científicas de La Sociedad Española de Ovinotecnia e Caprinotecnia*, 23, 1998, Victoria-Gasteiz. *Anais...* Victoria-Gasteiz: Sociedad Española de Ovinotecnia e Caprinotecnia, 1998. p.161-170.

LAUKOVÁ, A.; MARCINÁKOVÁ, M.; STROMPFOVÁ, V.; OUWEHAND, A. C. Probiotic potential of *Enterococci* isolated from canine feed. *Folia Microbiologica*, v.53, n.1, p. 84-88, 2008.

LIONG, M. T.; SHAH, N. P. Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of Lactobacilli Strains. *Journal of Dairy Science*, v.88, n. 1, p. 55-66, 2005.

LUND, B.; EDLUND, C. Probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient of the *vanA* gene cluster. *Clinical Infectious Diseases*, v.32, p. 1384-1385, 2001.

MAJAAMA, H.; ISOLAURI, E. Probiotics: A novel approach in the management of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.99, p. 179-185, 1997.

MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R.; ZANETTI, S.; DUPRE, I.; SECHI, L.A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology*, v. 88, n. 2, p. 291-304, 2003.

MARCINÁKOVÁ, M.; SIMONOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A. Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage. *Acta Veterinaria BRNO*, v.73, p. 513-519, 2004.

MARTINS, F. S.; TIAGO, F. C. P.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.5, n.2, p. 14-20, 2005.

MARTINS, M. P. R. V.; MIMOSO, M. C. E. M. Leite de Ovelha da Região de Azeitão. Grupos Microbianos. Trabalhos desenvolvidos no Núcleo de Tecnologia de Leite e Derivados, do Dep. Tecnol. Dos Produtos Agrários do EAN. *Investigação Agrária*, 2000.

MASON, I. L. *World Dictionary of Livestock Breeds*. C.A.B International. 1988. 348 p.

MATSUMOTO, K.; TAKADA, T.; SHIMIZU, K.; KADO, Y.; KAWAKAMI, K.; MAKINO, I.; YAMAOKA, Y.; HIRANO, K.; NISHIMURA, A.; KAJIMOTO, O.; NOMOTO, K. The effects of a probiotic milk product containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the defecation frequency and the intestinal microflora of sub-optimal health care state volunteers: a randomized placebo-controlled cross-over study. *Bioscience Microflora*, v.25, n.2, p.39-48, 2006.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALEZ, S.; OLIVER, G. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. *Journal of Food Protection*, v. 64, n. 4, p. 559-563, 2001.

MIRLOHI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; DOKHANI, S.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; ABGHARY, A. Investigation of Acid and Bile Tolerance of Native Lactobacilli Isolated from Fecal Samples and Commercial Probiotics by Growth and Survival Studies. *Iranian Journal of Biotechnology*, v.7, n.4, p. 233-240, 2009.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislações e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.3, n.2, p.99-112, 2006.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *Journal of Pediatrics*, v.82, n. 5, p. 189-197, 2006.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ALFIERI, P.; LODI, R.; TAMBURINI, A. Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Le Lait*, p. 181–192, 2005.

MOREIRA, J.L.S.; MOTA, R.M.; HORTA, M.F. *et al.* Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology*, v.5, n. 15, 2005.

MURRAY, B. E. The life and times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, p.46-65, 1990.

NEUMANN, E. *Comportamento “in vitro” de estirpes de Lactobacillus acidophilus sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo*. 1991. 86 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

NEVES, L. S. *Fermentado probiótico de suco de maçã*. 2005. 103f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 1, 2002.

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

PARK, S.C.; HWANG, M.H. ; KIM<sup>2</sup>, Y.H.; KIM, J.C.; SONG, J.C.; LEE, K.W.; JEONG, K.S.; RHEE, M.H.; KIM, K.S.; KIM, T.W. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.22, p. 35–37, 2006.

PEREIRA, D. I. A.; GIBSON, G. R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.9, p. 4689-4693, 2002.

PERSONI, L.; KOTZAMANIDES, C.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 109, n. 1, p. 109-120, 2006.

QUIGLEY, E. M. M. Probiotics in functional gastrointestinal disorders: what are the facts? *Current Opinion in Pharmacology*, v.8, p.704-708, 2008.

REDONDO, N. C. *Avaliação in vitro de características probióticas do Enterococcus faecium CRL183 e do Lactobacillus helveticus ssp jugurti 416*. 2008. 109f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

REIG, A. L. C.; ANESTO, J. B. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana de Alimentación e Nutrición*, v.16, n.1, p.63-68, 2002.

RESENDE, M. F. S. *Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas*. 2010. 36f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

REYSENBACH, A. L.; LONGNECKER, K.; KIRSHTEN, J. Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 9, p. 3798-3806, 2000.

RIBEIRO, L. C. *Produção, composição e rendimento em queijos do leite de ovelhas Santa Inês*. 2005. 77f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROBBERFROID, M. B. What is beneficial for health: the concept of functional food. *Food and Chemical Toxicology*, v.37, n.9/10, p. 1039-1041, 1999.

RODA, D. S.; DUPLAS, W.; SANTOS, L. E. et al. Produção de leite de ovelhas Ideal e Corriedale e desenvolvimento do cordeiro. *Boletim de Indústria Animal*, v.44, n.2, p.297-307, 1987.

ROSS, C.V. History and development of the sheep industry. In: *Sheep Production and Management*, 10, 1989, New Jersey: Prentice-Hall, p. 122-143, 1989.

SÁ, O.; SÁ, J. L.; *História dos Ovinos*. 2008. Disponível em <<http://www.crisa.vet.br/>>. Acesso em: 04 nov. 2009.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, v.42, n.1, p. 1-6, 2006.

SABIA, C.; MANICARDI, P.; MESSI, P.; NIEDERHAUSERN, S.; BONDI, M. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1

isolated from Italian sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 75, n. 1, p. 163-170, 2001.

SALMINEM, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y. K. Probiotics: how they should be defined? *Trends in Food, Science & Technology*, v.10, p.107-110, 1999.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SANTOS, M. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; GOMES, P. C.; SANTOS, J. L.; POZZA, P. C.; TESHIMA, E. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus* sp. sobre a microbiota intestinal de leitões. *Ciência Agrotécnica*, v.27, n.6, p. 1394-1400, 2003.

SARANTINOPOULOS, P.; KALATOPOULOS, G.; TASKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of greek feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v.76, n. 1, p. 93-105, 2002.

SBAF. *Mercado de Alimentos Funcionais: Desafios e Tendências*. 2008. Disponível em: <[http://www.sba.org.br/artigos\\_cientificos.htm](http://www.sba.org.br/artigos_cientificos.htm)>. Acesso em: 04 nov. 2009.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, v.17, p. 1262-1277, 2007.

SILVA, E.C. *Produção de leite de ovelhas Corriedale puras e mestiças e sua relação com o desenvolvimento com os cordeiros até o desmame*. 1998, 25 f., Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Produção Animal) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

SONN, H. Vaches et brebis latières en République Fédérale d'Allemagne. *La Tech*, v.407, p. 9-10, 1979.

SOUZA, A. C. K. O.; OSÓRIO, M. T. M.; OSÓRIO, J. C. S.; OLIVEIRA, N. M.; 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 Agrociência*, v.11, n.1, p.73-77, 2005.

STROMPFOVÁ, V.; MARCINÁKOVÁ, M.; SIMONOVÁ, M.; GANCACIRKOVÁ, S.; JONECOVÁ, Z.; SCIRANKOVÁ, L.; KOSCOVÁ, J.; BULECA, V.; CONBANOVÁ, K.; LAUKOVÁ, A. *Enterococcus faecium* EK13 - an enterocin A-producing strain with probiotic character and its effect in piglets. *Anaerobe*, v. 12, n. 5, p. 242-248, 2006.

SUMITA, T.C. *Caracterização de cepas de Lactobacillus isolados de fezes humanas quanto às propriedades probióticas*. 2007, 46 f., Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial – Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia - Universidade de São Paulo, Lorena.

TAGG, J. R.; DAJAMI, A. S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TANNOCK, G.W.; TISSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S. MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastro-intestinal tract, silage and yoghurt by the 16S-23S rDNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 9, p. 4264-4267, 1999.

TARAS, D.; VAHJEN, W.; MACHA, M.; SIMON, O. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *Journal of Animal Science*, v. 84, p. 608-617, 2006.

THOMAS, D. L.; BERGER, Y. M.; MCKUSICK, B. C. East Friesian germplasm: Effects on milk production, lamb growth, and lamb survival. *Journal of Animal Science*, v.77, p. 1-6, 2000.

TISSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rDNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, v. 35, n. 1, p. 49-56, 1997.

USDA. *Sheeps and Goats. Agricultural Statistics Board*. Washington D.C., 2011. 20 p.

VANKERCKHOVEN, V.; HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; SNAUWAERT, C.; SWINGS, J.; KLARE, I.; WITTE, W.; AUTGAERDEN, T. V.; CHAPELLE, S.; LAMMENS, C.; GOOSSENS, H. Genotypic diversity, antimicrobial resistance and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups in *Enterococcus faecium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.14, n.74, p. 4274-4255, 2008.

WALKER, D. K.; GILLILAND, S. E. Relationships among bile tolerance, bile salt desconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n. 4, p. 956-961, 1993.

WEIZMAN, Z.; ASLI, G.; ALSHEIKH, A. Effect of probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics*, v.115, p.5-9, 2005.

WENDORF, B. Economic potential for sheep dairy products in the U.S. In: *Proceedings, 1<sup>st</sup> Great Lakes Dairy Sheep Symposium*, 1995, Madison, *Anal...* Madison: Wisconsin Sheep Breeders Coop. Publ., 1995, p. 57-67.



## ANEXOS

Anexo 1. Alinhamento das sequências obtidas pelo sequenciamento do gene 16S do rRNA com as sequências depositadas *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST. Estão representados um isolado de cada umas das espécies identificadas pelo sequenciamento.

### Amostra 4.2 (*Enterococcus faecium*)

#### 14>G10 well G10 Placa193\_Seq\_060411 Run01 Cimarron 3.12 996 (Forward)

```
TCATCTATCCACCTTAGGCNGCTGGCTNAAAAGGTTACTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTACTCGTGGTGTGA
CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTC
ATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAAC
TCGTTGTACTTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT
CCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAAGCTGAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCG
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAACCATGCACCACCTGTCACTTTGACCCCCGAA
GGGGCAAAGGCTCCTTATACTCCTCAGAAGTTGGGGTTCACACACGGGCACTGTCTCAAGGACCTGGGTGAAAN
GGTTTTTTTCAGCGTTTTGCTTTCCGGCAATTTAAACCAACAATTGCTTCCCAACCGCGTTTTGNGCCGGGGCCCC
CGTGACATTCCTTTTGTAGTTTCAAACCTTTGCCGGGTCCGTTACTCCCCAAGGGCGCGAGTGCTTAATGCGGTTA
GCTTGCAGCAACTGCACAGGGCGTGAAAGGCCTCAAACACTTTAAGCACNTCAATTCGGTTTTACAGGCGTTGG
ACCTACCCAAGGGGTTAATCTAAATTCCTTGGTTTTGCTTCCCAAGGCTTTCGGAGGCCCTCCAAGCGTTTCAGTTT
AACACGAACCCAGGAAGGGAGCCCGGCCCTTCCGGCCACTGGGTGTCCCTCCCATTATTTTCTAAGGCATTTAC
CGGTTACACACCAGTTGGGATTTTCAGTTCTTCCGTCTTCTGGAGCTTCCAAGGTCTCTTCCCAGGTTTTTCCA
CTTGGAAC
```

#### 16>E11 well E11 Placa198\_Seq\_120411 Run01 Cimarron 3.12 754 (Reverse)

```
CCCATCATCTATCCACCTTAGGCCGCTGGCTTGCAAAAGGTTACTCACCGACTTCGCGGTGTTACAAACTCTCGTT
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGTCTGATCCGCGATTACTAGCGATT
CCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGAC
TTCGCAACTCGTTGACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATC
CCCACCTTCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAAGCTGAATGATGGCAACTAACAATAAGGGT
TGCGCTCGCTTGCGGGACTTNACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAGCGACAACCATGCACCACCTGTCACTTT
GACCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTCGGTCANAACGGATGTCACAGACCTGGTAAGGTGTCTTCGCGTT
GCTTCGCAATTAACCACATGCTCCACCGGTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTCAACCTTGCGGTC
GTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGANAGGGCGGAAACCNTCCAACACTTAGCACC
TCATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGTTTTCCGAGCCTTCAAGCGTCC
```

[gb|FJ378680.1|](#) *Enterococcus faecium* strain HN-N25 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length=1523

Score = 1223 bits (662), Expect = 0.0

Identities = 729/757 (96%), Gaps = 24/757 (3%)  
Strand=Plus/Minus

```
Query 1048 CCC-ATCATCTAT-CCACCTTAGGCCGCTGGCTTGCAAAAGGTTA-CTCACCGACTTCGC 1104
          ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1499 CCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCCGGCTGGC-TCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCG- 1442

Query 1105 GGTGTTACAAACTCTCGTTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA 1164
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1441 GGTGTTACAAACTCTCG-TGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA 1383

Query 1165 CCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCC 1224
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1382 CCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCC 1323

Query 1225 TACAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCG 1284
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1322 TACAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCG 1263

Query 1285 TTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACG 1344
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1262 TTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACG 1203

Query 1345 TCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAAGCTGAATG 1404
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1202 TCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAA-CTGAATG 1144

Query 1405 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGCTTGCGGGACTTNACCCAACATCTCACGACA 1464
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1143 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCG-TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA 1085

Query 1465 CGAGCTGAGCGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGACCCCGAAGGGGAAGCTCTATCT 1524
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1084 CGAGCTGA-CGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGACCCCGAAGGGGAAGCTCTATCT 1026

Query 1525 CTAGAGTCGGTCANAACGGATGTCACAGACCTGGTAAGGTGCTTCGCGTTGCTTCGCAA 1584
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1025 CTAGAGT-GGTCA-AA-GGATGTCA-AGACCTGGTAAGGT-TCTTCGCGTTGCTTCG-AA 972

Query 1585 TTAA-CCACATGCTCCACCGGTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACC 1643
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 971 TTAAACCACATGCTCCACCGC-TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTT-CAACC 914

Query 1644 TTGCGGTCGTACTIONCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGANAGGGCGG 1703
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 913 TTGCGGTCGTACTIONCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGA-AGGGCGG 855

Query 1704 AAACCNCTCCAACACTTAGCACCTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC 1763
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 854 AAACC-CTCCAACACTTAGCAC-TCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC 797

Query 1764 CTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTTCAAGCGTC 1800
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 796 CTGTTTGCTCCCCACGCTTTC-GAGCCT-CA-GCGTC 76
```

Score = 863 bits (467), Expect = 0.0  
Identities = 792/924 (86%), Gaps = 125/924 (14%)  
Strand=Plus/Minus

```
Query 26 TCATCTAT-CCACCTTAGGCNGCTGGCT-NAAAAGGTTA-CTCACCGACTTCGGGTGTTA 82
```



Amostra 8.2 (*Enterococcus durans*)

54>G12 well G12 Placa193\_Seq\_060411 Run01 Cimarron 3.12 611 (Foward)

TGGCGGCGTGCTATACTGCAGTTTTGAACGCTTCGTTTTGTCCANCGGANCTTGCTCCTCAGGAGACAAGAGGA  
GTGGCGAACGGGTGAGTAAGCACGTGGGTAACCGTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAAT  
ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTCGGGTGATCGCTGATGGATGGACCCGCG  
GTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGAGGTCGACGATGCATAGCCGACCTGAGGAGGGTGATCGG  
CCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGAGCAGTCAGGGAATCTTCGAGCAATGGACGAAAG  
TCTGACCGAGTCAACGCGNCGTGAGTGAAGAAGTTTTGCGATCGTAAAACTCTGTTGTCAGGAGAAGAAACAA  
AGGATGAGAGTAACCTTGTTTCATCCCTTTGGATCGGTATCTAACCCGAGAAAAGCCACGGGGCTAAACTACTGTTG  
CCAAGACAGCCGCGGGTAGTACGTTAGGGTGGGCACAAAGCCGTTTGGTCCCAGATTTTAATTGGGCGCGTAAA  
CGCCGAGGCGCANC

58>F08 well F08 Placa198\_Seq\_120411 Run01 Cimarron 3.12 915 (Reverso)

CCCATCATCTATCCACCTTAGGCCGTGGCTTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGCGGTGTACATAACTCTCGTGGT  
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGGCGTGCTTGATCCGCGATTACATAGCGAT  
TCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCGAGCCATACAAATCCGAAGTGAAGAGCTTTAAGAGATTAGCGTTAGCCTC  
GCGACGTTTGCAGCTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTATGCCAGGTCATAAGGGGCATGATAGAT  
ATTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCGAAC  
TAAACAATAAAGGGTTTTGCGCTCGTTTGGGGACTTAAACCCAACATCTCACGACAACGAGCTGACGACAAACC  
ATGCACCACCTGTCACTTTTGGCCCCGAAGTGGGGACAGCTCTATCTTAGAGATGAGTTCAAAGGGAATGTC  
AATGAACCTGGTGTAAGGGTTCTTACGCGTATGCTTCGGAATTAATACCACATGCTCCAACCGACTTTGGTG  
CGGGGGCCCCCGGTCAAATTTCCCTTTCTGAGTTTTTCAAACCTTTCGCGGGTTCGTTAACTCCCCAGTGCGGA  
GTTGCTTAACTTGCATTAGGCTGGCCANGGCACCTGACATGGGGCCGTGGAAAAGCCCTCCAACACACTTAN  
GCCACTCATTCGGTTTTACGGCGTGGAACCTANCCAGGGGTTAATCTAATCCTGTTTGTCCGCNCCAACGCTTTCG  
AGCCTTCAGCGGTCNAGTTACCATGACCCAGAGGAGGCCCGGCCTTTCGGACCAACTTGGTGGTTCCCTCCTNT  
ATTTTCTNACGGCCA

[gb|HQ677826.1](#) | *Enterococcus durans* strain 41D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1456

Score = 826 bits (447), Expect = 0.0  
Identities = 771/901 (86%), Gaps = 127/901 (14%)  
Strand=Plus/Minus

Query	668	CCCATCATCTAT-CCACCTTAGGCCG-TGGCT-TAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGCGG	724
Sbjct	1449	CCCATCATCTATCCCACCTTAGGCCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCG-GG	1391
Query	725	TGTTACATAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCAAC	784
Sbjct	1390	TGTTACA-AACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA-C	1333
Query	785	CGCGGCGTGCTTGATCCGCGATTACATAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCGAG	844
Sbjct	1332	CGCGGCGTGC-TGATCCGCGATTAC-TAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGC-AG	1276



Query	113	GTGAGTAAGCACGTGGGTAACCGTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGAAACAGGTGC	172
Sbjct	65	GTGAGTAA-CACGTGGGTAACC-TGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGAAACAGGTGC	122
Query	173	TAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGATC	232
Sbjct	123	TAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTG-TC	181
Query	233	GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGAGGTGC	292
Sbjct	182	GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC-AGG-C	239
Query	293	GACGATGCATAGCCGACCTGAGGAGGGTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCC-A	351
Sbjct	240	TACGATGCATAGCCGACCTGAG-AGGGTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCA	298
Query	352	AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTCAGGGAATCTTCGAGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAG	411
Sbjct	299	AACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-AGGGAATCTTCG-GCAATGGACGAAAGTCTGACCGAG	356
Query	412	TCAACGCCNCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTCAGGAGAAG	471
Sbjct	357	-CAACGCCG-CGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAA-CTCTGTTGTTAG-AGAAG	412
Query	472	AAACAAAGGATGAGAGTAACCTTGTTTCATCCCTTTGGATCGGTATCTAACCCGAGAAAAG	531
Sbjct	413	AA-CAA-GGATGAGAGTAAC-T-GTTTCATCCCTT-G-A-CGGTATCTAAC--AGAAA-G	462
Query	532	CCCACGGGCTAAACTACTGTTGCCAAGACAGCCGCGGGTAGTACGTTAGGGTGG	585
Sbjct	463	CC-ACGG-CTAA-CTAC-GT-GCCA-G-CAGCCGCGG-TAATACGT-AGG-TGG	506

Amostra 10.3 (*Enterococcus casseliflavus*)

61>C09 well C09 Placa219\_Seq\_180511 Run01 Cimarron 3.12 876 (Forward)

GTNTTNAACGCTTTTTCTTTACCCGAGCTTGCTCCNTCCGAAAGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT  
 GGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAGCACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAGCTATTTCCGCATG  
 GAAGAAAGTGTGAAAGGCGCTTTTTCGTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG  
 GCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC  
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAG  
 AAGGTTTTTCGGATCGGTAACCTCTGTTGTTAGGAGAAAGAACAAGGATGAGAGTAAACATTGTTTCAATCCCTT  
 TGAACCGGGTAATCTTAAACCCAGAAAAGGCCAACCGGGCTTAAACTTACGTTGCCAAGCAGGCCCGCGGGTT  
 AATTACGGTTAGGGTGGGCAAGGCGGTTTTGTCCGATTTCACTTGGGCGTAACACGCGAGGCGCAGGGCGG  
 GTTTCTTTCAGGTCTGATGTGAAAGGCCCCCCCGGGCTCAAACCGGGGGAAGGGTGCATTGGGAAAACCTGGG  
 GGAAGAAACTTTTGAAGTTGGCCACGAAACGNAGCGAACGAAGTTGGGAAATCCCAACTGGTTGTTAAGCCGGGT  
 GGACACACTGGCCGTTAGAAATCATACTGTTGGNACAGGNAACACCCAGTTGGGCCGAACAGGGGCGGGTCTCCT  
 TGGGTTCTGGTTAACTTGAACGGCCNTTGAAGGGGCTCCGAAAAGCCGTTGGGGGGGAGCCGAAACCC  
 CAGGGG

62>C10 well C10 Placa219\_Seq\_180511 Run01 Cimarron 3.12 634 (Reverse)

TNAACGCTTTTTCTTTCACCGGAGCTTGCTCCATCCGAAAGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGT  
AACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAGCACTTGAAACAGGTGCTAAGTACCGTATAACAGCTATTTCCGCATGGAA  
GAAAGTGTAAAGGCGCTTTTGCCTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCT  
CACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTAAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAC  
GGTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAAACAATGTTTCATCCCCTTTGGAACGG  
GTATCTAAACCNAGAAAAGGCCACGGGCTTAAACTAACGGTTGCCAGCCAGGCCGCGGGTTACATACGGTAA  
GGTTGGCAAAGCGGTTTGTCGGATTTAATTTGGGCCGTAAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGACAT  
GTGAAAGCCCCGGCTCAAACCGGGGAGGGTCATTTGGAACACTGGGAGACCTTTGAAGTTGGC

dbj|AB618809.1| *Enterococcus casseliflavus* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: C507  
Length=867

Score = 859 bits (465), Expect = 0.0  
Identities = 600/654 (92%), Gaps = 53/654 (8%)  
Strand=Plus/Plus

Query	959	aaCGCTTTTTCTTTCACCGGAGCTTGCTCCATCCGAAAGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTG	1018
Sbjct	33	AACGCTTTTTCTTTCACCGGAGCTTGCTCCA-CCGAAAGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTG	91
Query	1019	AGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAGCACTTGAAACAGGTGCTAAG	1078
Sbjct	92	AGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAA-CACTTGAAACAGGTGCTAA-	149
Query	1079	TACCGTATAACAGCTATTTTCCGCATGGAAGAAAGTGTGAAAGGCGCTTTTTCGGTCACTG	1138
Sbjct	150	TACCGTATAACA-CTATTTTCCGCATGGAAGAAAGT-TGAAAGGCGCTTTTTCGGTCACTG	207
Query	1139	ATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT	1198
Sbjct	208	ATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT	267
Query	1199	GCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	1258
Sbjct	268	GCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	327
Query	1259	ACGGGAGGCAGCAGTAAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCG	1318
Sbjct	328	ACGGGAGGCAGCAGTA-GGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCG	386
Query	1319	CGTGAGTGAAGACGGTTT-CGGATCGTAAA-CTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAG	1376
Sbjct	387	CGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAG	446
Query	1377	AGTAAACAATGTTTCATCCCCTTTGGAACGGGTATCTAAACCNAGAAAAGGCCACGGGC	1436
Sbjct	447	AGTAAA-A-TGTTTCATCCC-TT--G-A-CGG-TATCTAA-CC-AGAAA-G-CC-ACGG-C	492
Query	1437	TTAAACTAACGGTTGCCAGCCAGGCCGCGGGTTACATACGGTAAGGGTTGGCAAAGCG	1496
Sbjct	493	T-AA-CTA-CG-T-GCC-AGC-AG-CCGC-GG-T-A-ATACG-TA-GG-T-GGCAA-GCC	535
Query	1497	GTTTGTCCGGATTTTAATTTGGGCCGTAAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAC	1556

Sbjct	536	 -TT-GTCCGGATTT-A-TT-GGGC-GTAAA-GCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA-	587
Query	1557	ATGTGAAAGCCCC-GGCTCAAACCGGGGAGGGTCATTTGGAACACTGGGAGAC	1609
Sbjct	588	 -TGTGAAAGCCCCCGGCTCAA-CCGGGG-AGGGTCATT-GGAA-ACTGGGAGAC	636

Score = 778 bits (421), Expect = 0.0  
Identities = 598/669 (89%), Gaps = 69/669 (10%)  
Strand=Plus/Plus

Query	32	AACGCTTTTTCTTTACCGGAGCTTGCTCCNTCCGAAAGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTG	91
Sbjct	33	 AACGCTTTTTCTTTACCGGAGCTTGCTCC-ACCGAAAGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTG	91
Query	92	AGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAGCACTTGGAACAGGTGCTAAT	151
Sbjct	92	 AGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAA-CACTTGGAACAGGTGCTAAT	150
Query	152	ACCGTATAACAGCTATTTTCCGCATGGAAGAAAGTGTGAAAGGCGCTTTTTCGCTCACTGA	211
Sbjct	151	 ACCGTATAACA-CTATTTTCCGCATGGAAGAAAGT-TGAAAGGCGCTTTTTCGCTCACTGA	208
Query	212	TGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG	271
Sbjct	209	 TGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG	268
Query	272	CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA	331
Sbjct	269	 CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA	328
Query	332	CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG	391
Sbjct	329	 CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG	388
Query	392	TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGGTAAAACCTCTGTTGTTAGGAGAAAGAACAAGGATGA	451
Sbjct	389	 TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCG-TAAAACCTCTGTTGTTAG-AGAA-GAACAAGGATGA	445
Query	452	GAGTAAAACATTGTTTCATTCCCCTTTGAACCGGGTAATCTTAAACCCAGAAAAGGCCAA	511
Sbjct	446	 GAGTAAAA--T-GTT-CAT-CCC-TT-GA-C-GG-TA-TCT-AA-CC-AGAAA-G-CCA-	488
Query	512	CCGGGCTTAAACTTACGTTGCCCAAGCAGGCCCGGGGTTAATTACGGTTAGGGTGGGC	571
Sbjct	489	 C-GG-CT-AA-CT-ACGT-GCC-A-GCAG-CC-G-CGG-T-AAT-ACG-T-AGG-TGG-C	530
Query	572	CAAGGCGGTTTTGTCCGGATTTCACTTGGGGCGTAACACGCGAGGCGCAGGGCGGGTTTC	631
Sbjct	531	 -AAG-CG-TT--GTCCGGATTT-A-TTGGG-CGTAA-A-GCGAG-CGCAGG-CGG-TTTC	577
Query	632	TTTCAGGTCTGATGTGAAAGGccccccGGGCTCCAAACCCGGGGGAAGGGGTCATTGGG	691
Sbjct	578	 TTA-AG-TCTGATGTGAAAG-CCCC--GG-CTC-AA-CC-GGGG-A-GGG-TCATTGG-	624
Query	692	AAAACCTGGG	700
Sbjct	625	 AAA-CTGGG	632