



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

ISABELLA ALBUQUERQUE RAMALHO

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES DA KAPPA-CASEÍNA E BETA-
LACTOGLOBULINA NA COMPOSIÇÃO DO LEITE E RENDIMENTO DO QUEIJO
MUÇARELA DE BÚFALA DA RAÇA MURRAH NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

RECIFE – PE

2017

ISABELLA ALBUQUERQUE RAMALHO

ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES DA KAPPA-CASEÍNA E BETA-LACTOGLOBULINA NA COMPOSIÇÃO DO LEITE E RENDIMENTO DO QUEIJO MUÇARELA DE BÚFALA DA RAÇA MURRAH NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Lopes de Mendonça.

RECIFE – PE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

R165e Ramalho, Isabella Albuquerque
Estudo do polimorfismo dos genes da kappa-caseína e beta-lactoglobulina na composição do leite e rendimento do queijo muçarela de búfala da raça Murrah no estado de Pernambuco
estrongilídeos parasitos de equinos na pastagem / Isabella Albuquerque Ramalho. – 2017.
67 f. : il.

Orientador: Manoel Adrião Gomes Filho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências e anexo(s).

1. Queijo muçarela 2. Leite de búfala 3. Proteínas do leite
4. Marcadores moleculares I. Gomes Filho, Manoel Adrião, orient.
II. Título

CDD 636.089

ISABELLA ALBUQUERQUE RAMALHO

ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES DA KAPPA-CASEÍNA E BETA-LACTOGLOBULINA NA COMPOSIÇÃO DO LEITE E RENDIMENTO DO QUEIJO MUÇARELA DE BÚFALA DA RAÇA MURRAH NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau do Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, a disposição na Biblioteca Central desta Universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitada às normas éticas científicas.

Isabella Albuquerque Ramalho (Discente)

Aprovada em: 29 / 05 /2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE
Orientador/Presidente

Prof^a. Dr^a. Laura Leandro da Rocha
Departamento de Zootecnia – UFRPE (Unidade Serra Talhada)

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Departamento de Biologia – UFRPEL

Prof. Dr^a. Silvany de Sousa Araujo
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Dedico este trabalho aos meus pais, Vera Lúcia Albuquerque Ramalho, Erika Santos da Silva (Mãe de Coração) e Waldo Alves Ramalho, que estão sempre presentes em minha vida dando o apoio necessário em todas as situações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, o que seria de nós sem a fé, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais, e toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse a mais essa etapa de minha vida.

Ao Professor Doutor Manoel Adrião Gomes Filho, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Ao Coordenador do Curso, Professor Doutor Anísio Soares, pelo apoio e incentivo desde o início de todo processo seletivo.

Aos demais Professores do curso, em especial as Professoras Doutoras Áurea Wischral, Elizabete Cristina da Silva, Laura Leandro da Rocha, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta dissertação e aos Professores Doutores Paulo Souza, Reginaldo Carvalho, que tiraram todas as minhas dúvidas ligadas a Genética.

Ao longo desses anos fiz muitos amigos nesta universidade, que tenho certeza, muitos levarei para vida toda. Agradeço aos amigos Arturene Rocha, Diogo Silva, Ellen Cordeiro, Ericka Queiroz, Jamilly Lopes, Luciana Amaral de Mascena e Silvany Araújo do Laboratório FAMA, pelo incentivo e apoio constantes.

Agradeço à FACEPE pelo auxílio financeiro, o qual possibilitou a realização deste trabalho dissertativo.

Agradecimentos também aos Proprietários e Funcionários das fazendas onde foram feitas as coletas do material biológico, pela sua disponibilidade, compreensão, apoio e atitude de seguir junto conosco nessa luta por novas pesquisas.

"És forte porque estás próximo da origem da criatura. És nutritivo porque manténs o melhor do leite. És quente, porque és gordo..."

(Hipócrates/450 a.c.)

RESUMO

A bubalinocultura e a produção de leite de búfala do Estado de Pernambuco vem se destacando devido à excelente qualidade sensorial e nutricional, gerando assim um queijo de alto teor de gordura, proteína e sólidos totais, com maior aceitabilidade pelo consumidor, durabilidade do produto e rendimento industrial. Esses resultados são possíveis devido a uma alimentação balanceada, um manejo sanitário adequado e boas condições de manejo durante o processo de ordenha dos animais. O queijo muçarela é o principal derivado lácteo fabricado com leite de búfala consumido no Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de polimorfismo nos genes Kappa-caseína e Beta-lactoglobulina em búfalas da raça Murrah e analisar a composição do leite e rendimento de queijo muçarela. As análises individuais de composição do leite (proteínas, gordura, sólidos totais, CCS) foram realizadas no Laboratório de Análise de Qualidade de Leite da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PROGENE-UFRPE). As análises de cinco amostras de queijo muçarela avaliando os seguintes parâmetros: proteína total, gordura total e sólidos, tendo sido observado que todos os parâmetros seguiram o padrão estabelecido na Instrução Normativa Nº 62, 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Os polimorfismos nos genes Kappa-caseína e Beta-lactoglobulina foram determinados por PCR-RFLP e a população de estudo foi composta por 300 amostras de sangue de búfalas sadias provenientes de empresas rurais onde há registro de produção através do programa Prodap Profissional GP. Todas as búfalas avaliadas apresentaram genótipo BB para o gene da Kappa-caseína e AA para o gene Beta-lactoglobulina. Diante do exposto, os genótipos BB e AA para os genes da Kappa-caseína e Beta-lactoglobulina estão relacionados com a alta qualidade do leite e rendimento de queijo muçarela em búfalas da raça Murrah, resultando numa alta taxa de homozigose e alto monomorfismo observados nos *loci* gênicos analisados.

Palavras-chave: queijo muçarela; leite de búfala; proteínas do leite; marcadores moleculares.

ABSTRACT

Buffalo breeding and buffalo milk production in the State of Pernambuco has been notable for its excellent quality and nutritional value, thus generating a cheese with a high fat content, protein and total solids, with greater consumer acceptability, product durability and industrial profits. These results are possible due to a cattle's balanced diet, adequate sanitary management and good handling conditions during its milking process. The mozzarella cheese is the main dairy product from buffalo milk consumed in Brazil. The objective of this study was to evaluate the presence of polymorphism in the Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes in Murrah buffaloes and to analyse the milk composition and the production of mozzarella cheese. The individual analysis of milk composition (proteins, fat, total solids, CCS) were carried out at the Laboratory of Analysis of Milk Quality of the Federal Rural University of Pernambuco (PROGENE-UFRPE). The analysis of five samples of cheese were evaluated in the following parameters: total protein, total fat and solids. It was observed that all the parameters followed the standard established in the Normative Instruction No. 62, August 26, 2003 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply - Secretary of Agricultural Defense. Polymorphisms in the Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes were determined by PCR-RFLP and the study population was composed of 300 blood samples from healthy buffaloes from rural companies where production is recorded for the Prodap Professional GP program. All evaluated buffaloes showed a BB genotype for the Kappa-casein gene and AA for the beta-lactoglobulin gene. Considering the above, the BB and AA genotypes for the Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes are related to the high quality of the milk and the production of mozzarella cheese in Murrah buffaloes, resulting in a high homozygous and a high monomorphism rate observed in the genetic *loci* analysed.

Key words: mozzarella cheese; buffalo milk; milk proteins; molecular markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Parte Textual

Figura 1. Raças bubalinas reconhecidas pela ABCB no Brasil.....	20
Figura 2. Efetivo bubalino segundo as grandes regiões do Brasil.....	22
Figura 3. Tamanho do mercado de queijos no Brasil (Volume e Valor) e projeções até 2017.....	28
Figura 4. Ponto de corte das enzimas de restrição utilizadas.....	32
Figura 5. Coagulação enzimática no processo de fabricação de queijos.....	34

Artigo Científico

Figura 1.: Eletroforese de produtos de PCR e PCR-RFLP do gene da κ -Cn (379pb) e β -Lg (247pb). M - Marcador de 50pb; CN - controle negativo; κ -Cn – Produto de amplificação da κ -Cn; 1 e 2 - Produtos de digestão da κ -Cn, padrão de bandas de 225pb e 154pb; β -Lg – Produto de amplificação da β -Lg; 3 e 4 - Produtos de digestão da β -Lg, padrão de bandas de 148pb e 99pb. κ -Cn - Kappa-Caseína, β -Lg- Beta-Lactoglobulina.....	64
---	----

LISTA DE TABELAS

Parte Textual

Tabela 1: Valores médios dos componentes e da contagem de células Somáticas (CCS) de leite de búfalas da região do Alto São Francisco (MG).....30

Artigo Científico

Tabela 1: Composição do leite e do queijo muçarela de búfalas com genótipos BB e AA para os genes da κ -Cn e β -Lg respectivamente.....65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa – Aminoácidos.

ABCB – Associação Brasileira de Criadores de Búfalos.

ANUALPEC - Anuário da Pecuária Brasileira.

β-Ig – Beta Lactoglobulina.

CCS – Contagem de Células Somáticas.

CN – Controle Negativo.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

DNA - Ácido Desoxirribonucléico.

DOP - Denominação de Origem Protegida.

EHS - Extrato Hidrossolúvel de Soja.

EST - Extrato Seco Total.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação).

FACEPE - Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

HPLC - High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

IDF - International Dairy Federation.

IgA – Imunoglobulina do tipo A.

IEF – Eletroforese em gel (gel electrofocusing).

IgM - Imunoglobulina do tipo M.

k-cn - Kappa Caseína.

LAAPA - Laboratório de Análise Ambientais e Produtos Alimentícios.

MAPA – Ministério Da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

MU – Murrah.

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase).

PCR-RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo com Fragmentos de Restrição).

PROGENE - UFRPE - Laboratório de Análise de Qualidade de Leite da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

RBQL - Rede Brasileira de Qualidade do Leite.

SA - Soro Albumina.

SPN's - Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Simples).

ST - Percentagem de Extrato Seco dos Queijos.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 BÚFALOS.....	19
2.2 RAÇA MURRAH.....	20
2.3 HISTÓRICO DA BUBALINOCULTURA NO BRASIL.....	21
2.4 COMPOSIÇÃO DO LEITE DE BÚFALA.....	22
2.5 QUEIJO MUÇARELA.....	26
2.6 RENDIMENTO DO QUEIJO MUÇARELA DE BÚFALA.....	28
2.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE SEGUIDA DE DETECÇÃO DE POLIMORFISMO DE TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (PCR- RFLP).....	30
2.8 KAPPA CASEÍNA.....	32
2.9 BETA LACTOGLOBULINA.....	34
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
4. OBJETIVOS	47
4.1 OBJETIVO GERAL.....	47
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
5. ARTIGO CIENTÍFICO	49
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
7. ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), em 2013 a população mundial de búfalos abrangia mais de 199 milhões de animais, distribuídos em 42 países. Ainda segundo dados desta mesma Organização em 2006, a produção mundial de carne bubalina vem apresentando crescimento significativo, principalmente no Oriente, destacando-se a Índia, Paquistão e China como principais países produtores.

O Brasil configura-se como primeiro produtor de carne bubalina dada a sua extensão territorial, aliada às condições favoráveis de clima e de solo, o que facilita à ostentação da produção de bubalinos, a médio e a longo prazo, com melhor desempenho em termos quantitativos e qualitativos. Apesar de haver poucas unidades industriais capacitadas para o processamento do leite de búfala, existe um grande interesse, por parte dos laticínios, em reter o leite bubalino para produção de queijos. Suas características marcantes contribuem para a produção de derivados com qualidade nutricional e maior valor agregado (BERNARDES, 2007).

A introdução de búfalos no Brasil foi motivada mais por seu exotismo que por suas qualidades zootécnicas e a chegada dos mesmos ocorreu no final do século XIX, oriundos da Ásia, Europa (Itália) e Caribe (BERNANRDES, 2007). Essa chegada em território nacional, foi caracterizada por pequenos lotes de animais em épocas distintas (SANTIAGO, 2000) e o primeiro aporte da espécie se deu na Amazônia por volta de 1890/1895 quando animais de variedade Malaia ou Chinesa foram trazidos por refugiados da Guiana Francesa.

Já no início do século XX tem-se confirmado as importações feitas por Bertino Lobato de Miranda e Vicente Chermont de Miranda para a Ilha de Marajó. São reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB, 2014) quatro raças: Mediterrâneo (Italiana), Murrah (Indiana), Jafarabadi (Indiana), chamado também de búfalo-do-rio e Carabao (Sudeste asiático), ou búfalo-do-pântano.

Hoje, a criação de búfalos se dá em propriedades de pequeno a médio porte, e o efetivo nacional desse rebanho foi de 1,32 milhão de cabeças em 2014, sendo este efetivo concentrado na Região Norte (66,5%), onde os maiores rebanhos encontram-se nos Estados do Pará (37,4%) e Amapá (21,7%). A Região Sudeste na sequência, com 11,3%, localizado, principalmente, nos Estados de São Paulo (6,2%) e Minas Gerais (4,3%). O Nordeste é a região com o terceiro maior rebanho (9,1%), sendo seu principal representante o Estado do Maranhão (6,1%). O Sul participou com 8,1%, sendo o efetivo localizado, principalmente, no Estado do Rio Grande do Sul (5,1%). O Centro-Oeste ficou com os demais 5,0%, com maior participação no Estado de Goiás (2,5%) (IBGE, 2014).

Os sistemas de exploração bubalina no Brasil são classificados como extensivos a princípio destinados a produção de carne, mas em meados dos anos 90 houve interesse pela produção leiteira. Segundo Bernardes (2007) quando se observa a criação de bovinos leiteiros, verifica-se que ela vem diminuindo nas pequenas propriedades rurais, fenômeno inverso a bubalinocultura leiteira. Quando comparado com o leite de outras espécies, o leite de búfala confere aos derivados lácteos propriedades sensoriais peculiares, permitindo a elaboração de produtos com características tecnológicas próprias e maior rendimento industrial. Tais propriedades são derivadas dos maiores teores de proteínas, gorduras, vitaminas, extrato seco total (EST) e minerais presentes em sua composição (CUNHA NETO et al., 2005).

A produção de leite de Búfala no Brasil, é estimada em 92,3 milhões de litros, produzidos por cerca de 82.000 búfalas em 2.500 rebanhos calculando-se que existam pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas no país. Estas indústrias transformam anualmente 45 milhões de litros de leite em 18,5 mil toneladas de derivados, gerando um faturamento bruto da ordem de U\$ 55 milhões aos laticínios e de cerca de U\$ 17 milhões aos criadores (BERNARDES, 2007).

Segundo BORGES et al. (2009), a produção e procura do leite de búfala e seus derivados vêm aumentando e ganhando uma grande importância no Brasil, nos últimos

5 anos, sendo o queijo muçarela o produto de maior destaque com rendimento entre 20 a 25% (ROSSI, 1998). A produção de leite de búfala é totalmente absorvida pelo mercado interno brasileiro e, além deste queijo, o leite bubalino é utilizado na fabricação de outros derivados, tais como queijo tipo minas frescal, provolone, ricota, manteiga, requeijão, doce de leite e iogurte (BERNARDES, 2007).

Os diferentes tipos de queijo requerem uma técnica de produção específica, sendo que quando processados, a partir do leite de búfala apresentam um maior rendimento. Esta característica do leite de búfala está relacionada as suas proteínas, dentre elas as caseínas, que exercem papel importante na fabricação de queijos, uma vez que determinam a coagulação e o rendimento, pois quanto maior sua concentração no sistema coloidal, maior o rendimento (AQUARONE et al. 2001).

As principais proteínas presentes no leite de búfala são: α 1-caseína, α 2-caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina. A função biológica das caseínas na glândula mamaria é transportar cálcio, fosfato e proteína para o neonato (KRUIF; HOLT, 2003), a κ -caseína está em maior quantidade no leite bubalino quando comparado com leite de vaca, e o processo de coagulação é acelerado devido a uma menor quantidade de quimosina para a fabricação de queijos. Entretanto, o gene da β -lactoglobulina (β -LG) não tem um papel definido na coagulação do leite mas tem sido focado o seu polimorfismo com características de produção e na indústria tecnológica do leite (FOX E MCSWENEEY, 2003; ORNER; ELMACI, 2006; WALSTRA et al., 2006; EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011).

A associação da Biologia Molecular com a Produção Animal vem desempenhando papel importante em programas de conservação e melhoramento genético. O uso de marcadores moleculares em seleção assistida vem proporcionando descobertas que auxiliam nas seleções de reprodutores e avaliações de progênes. Recorrendo a estudos, utilizando marcadores moleculares associados a programas de conservação e de melhoramento genético nacionais em bubalinos no sentido de promover uma maior produção do leite e fabricação de derivados lácteos (MALHADO,

2008; CASSIANO et. al., 2004; TONHATI et al. 2002), em animais de produção como os bovinos e bubalinos, observou-se variantes alélicas dos genes da k-CN e da β -LG, sendo estas variantes, relacionadas com características zoogenéticas (FOX; MCSWENEEY, 2003; ORNER; ELMACI, 2006; WALSTRA et al., 2006).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar os genótipos do gene da Kappa-caseína e Beta-lactoglobulina através da técnica de PCR-RFLP em búfalas da raça Murrah no Estado de Pernambuco e correlacionar seus genótipos com a produção e composição do leite e rendimento de queijo muçarela.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BÚFALOS

Os búfalos são animais domésticos, de origem asiática, introduzidos na África, Europa e, mais recentemente, no continente americano. São animais utilizados para produzir carne e leite para o consumo humano e pertencem à ordem Artiodactyla, Subordem: Ruminatia, Família: Bovidae, cuja sub-família Bovinae compreende seis gêneros: *Angra*, *Bibos*, *Bison*, *Bos*, *Bubalus* e *Syncerus*. O Gênero *Syncerus* representa os búfalos selvagens de origem africana e o Gênero *Bubalus* compreende os búfalos de origem asiática. Deste último, somente os búfalos da espécie *Bubalus bubalis* são criados para fins econômicos (búfalos domésticos) (LENSTRA; BRADLEY, 1999). O gênero *Bubalus* está dividido em duas Sub-espécie: *Bubalus bubalis* (Búfalo do rio ou River Buffalo), com $2n=50$ cromossomos e *Bubalus bubalis kerebau* ou Carabao (Búfalo do pântano ou Swamp Buffalo), com $2n=48$ cromossomos (PEARY, 1990).

Atualmente a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), estima que a população mundial de búfalos abrange 200 milhões de animais, distribuídos em 42 países (FAO, 2014). É considerado o animal doméstico mais dócil do planeta, o que facilita sua criação e manejo e dotado de extrema versatilidade para se adaptar as mais variadas condições climáticas (Frio da Europa Oriental, aos desertos da África, nas regiões tropicais da Amazônia, nos sertões nordestinos e nas diferentes altitudes) (FAO, 2000; SILVA et al., 2005).

No Brasil são reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos quatro raças: Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi (búfalo-do-rio) e Carabao (búfalo-do-pântano) (Figura 1). Os animais da raça Mediterrâneo têm origem italiana, possuem aptidão tanto para produção de carne quanto de leite, apresentam porte médio e são medianamente compactos. A raça Murrah, de origem indiana, apresenta animais com conformação média e compacta, cabeças leves e chifres curtos, espiralados enrodilhando-se em anéis na altura do crânio. A raça Jafarabadi, também indiana, é menos compacta e de maior porte, apresenta chifres longos e de espessura fina, com

uma curvatura longa e harmônica. A raça Carabao é a única adaptada às regiões pantanosas, e está concentrada na ilha de Marajó, no Pará. Teve sua origem no norte das Filipinas, apresenta pelagem mais clara, cabeça triangular, chifres grandes e pontiagudos, voltados para cima, porte médio e capacidade para produção de carne e leite, além de serem bastante utilizados como força motriz (ABCB, 2014).



Figura 1 – Raças bubalinas reconhecidas pela ABCB. Fonte: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos – ABCB.

2.2 RAÇA MURRAH

Principal raça leiteira da Índia é encontrada especialmente nos distritos de Rohtak, Hisar, Jind, Haryana, Nabha, Patiala e Punjab. No Brasil o rebanho está se formando por absorção Genética de animais importados e seus descendentes, nos plantéis sem raça definida.

As características marcantes dessa espécie são chifres curtos, finos e pequenos, curvando para trás e para cima em forma de espiral; fronte larga com pequena convexidade e cara estreita; pelagem preta sem manchas brancas, com tufo de pelos

brancos na vassoura da cauda. Apresenta barbela muito curta, úbere e tetas bem desenvolvidas com veias mamárias sinuosas e ramificadas e a produtividade leiteira encontra-se entre 1.500 a 2.500 kg de leite por lactação. Ao nascer pesa em média 30 kg, e quando adultos pesam em média 430 a 500 kg (Fêmeas) e 530 a 575 kg (Machos) (BERNARDES, 1997).

Tem aparência reveladora de saúde e vigor, constituição robusta, com masculinidade e feminilidade segundo o sexo; tamanho indicativo do crescimento por idade, sendo de porte médio a grande e de corpo simétrico e equilibrado. A conformação própria do tipo morfo-fisiológica misto, com prevalência leiteira, além de incluir exigências de aprumos normais, com cascos fortes e bem conformados. Apresenta uma reprodução de aparência normal quanto ao tamanho da bolsa escrotal e vulva, além do número de testículos e tetas (não são avaliadas as tetas extranumerárias) e tem um temperamento manso ou dócil (ABCB, 2014).

2.3 HISTÓRICO DA BUBALINOCULTURA NO BRASIL

Existem relatos que os primeiros Búfalos, cerca de 200 animais, teriam entrado no Brasil pela Amazônia, entre 1890 - 1895, trazidos pelo Dr. Vicente Chermont de Miranda, em um barco que aportou na costa norte da Ilha do Marajó. Vieram espécies de origem Maláia ou da China, mas provenientes de Ilha do Caribe ou das Guianas, onde foram introduzidos pelos colonizadores ingleses e holandeses (ABCB, 1960).

O efetivo de bubalinos foi de 1,32 milhão de cabeças em 2014 (Figura 2), sendo 1,0% menor que o registrado em 2013. Este efetivo é concentrado na Região Norte (66,5%), com os maiores rebanhos encontrados nos Estados do Pará (37,4%) e Amapá (21,7%). Os Municípios de Chaves (PA), Soure (PA) e Cutias (AP) registraram os maiores efetivos de bubalinos no Brasil, conservando as mesmas posições ocupadas em 2013. Região Sudeste na sequência, com 11,3% do total localizado, principalmente, nos Estados de São Paulo (6,2%) e Minas Gerais (4,3%). O Nordeste é a região com o terceiro maior rebanho (9,1%), sendo seu principal representante o Estado do

Maranhão (6,1%). O Sul participou com 8,1%, sendo o efetivo localizado, principalmente, no Estado do Rio Grande do Sul (5,1%). O Centro-Oeste ficou com os demais 5,0%, com maior participação no Estado de Goiás (2,5%). Todas as Grandes Regiões apresentaram redução do número absoluto de bubalinos (IBGE, 2014).

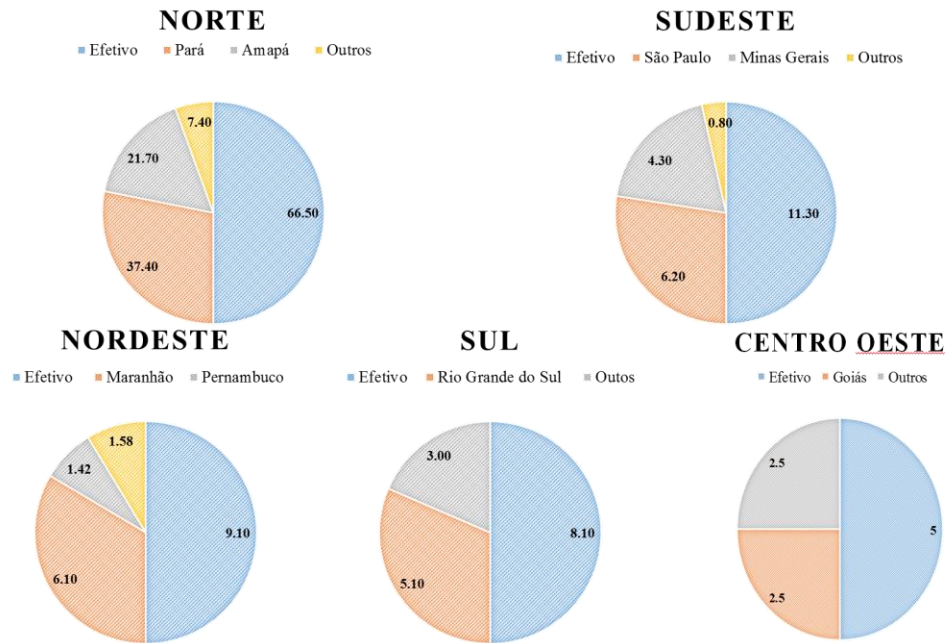


Figura 2 - Efetivo bubalino segundo as grandes regiões do Brasil. Fonte: Adaptado do IBGE.

2.4 COMPOSIÇÃO DO LEITE DE BÚFALA

Nos últimos anos houve acentuado aumento na exploração da bubalinocultura para a produção de leite em virtude de apresentar elevado valor nutricional, maiores teores de gordura, proteínas e minerais, podendo ser utilizado tanto para o consumo “in natura” como matéria-prima para elaboração de produtos lácteos que podem variar de acordo com as condições edafoclimáticas de cada região (ARAÚJO et al., 2011). Esse aumento da produção e qualidade do leite está sendo alcançado por meio de estratégias como nutrição adequada, boas práticas de manejo, controle de doenças e melhoramento genético (DOMINGUES; LANGONI, 2001; KIPLAGAT; LIMO; KOSGEY, 2012).

Quando comparado com o leite de outras espécies, o leite de búfala confere aos derivados lácteos propriedades sensoriais peculiares, permitindo a elaboração de produtos com características tecnológicas próprias e maior rendimento industrial. Tais propriedades são derivadas dos maiores teores de proteínas, gorduras, vitaminas, Extrato Seco Total (EST) e minerais presentes em sua composição (CUNHA NETO et al., 2005).

O leite de búfala possui 33% menos colesterol e mais 48% de proteínas, 59% de cálcio e 47% de fósforo quando comparado ao leite bovino (HÜHN et al., 1986). O rendimento industrial do leite bubalino é 40% superior ao leite bovino, sendo de extrema importância no aproveitamento da fabricação de derivados lácteos (SOUSA et al., 2002). Uma vez que o soro de leite de búfala apresentou teores médios de proteína, gordura e lactose acima das médias encontradas no soro de leite de vaca (LIRA et al., 2009). A coloração do leite de búfala é totalmente branca devido a ausência total de pigmentos carotenoides, o que confere a mesma coloração à manteiga e ao queijo produzidos (MOZZARELLADIBUFALA, 2004).

Em países como a Itália, o leite de búfala é pouco utilizado para o consumo *in natura*, sendo a quase totalidade destinada à fabricação de derivados, em especial a muçarela, que possui Denominação de Origem Protegida (DOP) (BUZI et al., 2009). Estima-se que a produção de leite de búfala no Brasil seja de mais de 92 milhões de litros de leite/ano, sendo metade destinada à industrialização (KISS, 2012), com a produção de diversos tipos de produtos lácteos como queijos, requeijão, manteiga, iogurte, dentre outros. A muçarela, no entanto, é o principal produto (BUZI et al., 2009), devido a tendência histórica de seu consumo (RODRIGUEZ et al., 2008).

As principais proteínas presentes no leite de búfala são: α 1-caseína, α 2-caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina. Por possuir uma maior quantidade de κ -caseína em relação ao leite de vaca, o processo de coagulação do leite bubalino é acelerado, exigindo uma menor quantidade de quimosina para a fabricação de queijos. A concentração relativa do soro e proteínas é muito semelhante

nas duas espécies, e tanto para o soro do leite bovino quanto para o soro do leite bubalino, a β -lactoglobulina (β -lg) está presente em maior quantidade ($\cong 50\%$), seguida pela α -lactoalbumina (α -la) e soro albumina (SA). Há também proteínas em quantidades menores como lactoferrina, imunoglobulinas, lactoperoxidase, lisozimas, lípases, proteases, entre outras (EMMONS et al., 2010; YAHYAOUUI et al., 2003; EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011).

De acordo com Aquarone et al. (2001), dentre as proteínas presentes no leite as caseínas exercem papel importante na fabricação de queijos, influenciando na coagulação e no rendimento, pois quanto maior sua concentração no sistema coloidal maior o rendimento.

Micelas das caseínas têm a função de sequestrar partículas de fosfato de cálcio no leite, caracterizando-se como a principal fonte desses minerais para a nutrição de neonatos. O transporte de fosfato de cálcio por meio dessas micelas contribui tanto para os processos de mineralização dos ossos de recém-nascidos quanto para o controle da concentração de cálcio e fosfato no leite, impedindo a calcificação das glândulas mamárias (HOLT et al., 2013).

A lactoferrina, substância inespecífica com papel importante na defesa da glândula mamária. É uma proteína com a função de quelar o ferro, e não o deixar solúvel para o uso dos microorganismos. É importante notar que o ferro, não disponível ou disponível em menor concentração para as bactérias, ainda é passível de absorção intestinal no consumidor do leite, e, portanto, níveis maiores de lactoferrina no leite contribuem para melhor alocação do metal (PUVOGEL, 2005). O leite bubalino possui quantidade de lactoferrina superior ao leite bovino e essa quantidade varia durante a lactação normal, com a quantidade colostrar atingindo níveis duas vezes maiores do que os encontrados no início do período lactante, tanto em vacas como em búfalas (BHATIA; VALSA, 1994ab).

As imunoglobulinas são substâncias liberadas no canal do teto e ajudam na prevenção e no controle de infecções nesse local. Os anticorpos são disponibilizados pela búfala através do leite, com mudança qualitativa e quantitativas através da lactação nas primeiras duas semanas. Em búfalas egípcias (MAHRAN et al., 1997), evidenciaram o gradual aumento de proporção das imunoglobulinas classe G1 e G2, em detrimento de IgM e IgA no leite de búfalas sem sinais de mastite, todavia esta proporção é alterada quando da infecção experimental, segundo a revisão de Butler em 1999, sobre as tentativas anteriores de atingir uma resposta humoral a antígenos da glândula mamária (em bovinos, ovinos e murinos). A presença de anticorpos no leite serve mais ao bezerro do que propriamente à búfala, mas a concentração de anticorpos nas secreções mamárias pode ser uma medida direta da maturidade ou salubridade imune da búfala.

A lactoperoxidase, considerada também uma substância não específica no leite, tem a função de ajudar na prevenção e no controle das infecções mastíticas. É uma enzima que, na presença de tiocianato e peróxido de hidrogênio, apresenta atividade bacteriostática contra bactérias gram-positivas e bactericida para as gram-negativas, (KUMAR; BHATIA, 1994). Esta enzima apresenta atividade 23% maior no leite de búfala, quando comparado com o de vaca, o que contrasta com os resultados encontrados por (HARNULV; KANDASAMY, 1982). Além de suas atividades de proteção do teto, a enzima é usada para aumentar a vida útil do produto lácteo nas gôndolas e , assim sendo, uma maior atividade no leite bubalino pode significar possibilidade de seu uso em produtos com maior vida de prateleira do que o leite de vaca.

No Brasil, a produção média de leite bubalino tem alcançado 1.583,7 litros por lactação com média diária de 7,3 litros por animal, sendo que cerca de 30% das búfalas produzem mais de 2.000 litros de leite por lactação. Já a produção média das fêmeas bovinas encontra-se ao redor de 1.290 litros por lactação com média diária de 4,3 litros por animal (ANUALPEC, 2009; NARDI JUNIOR, 2012).

2.5 QUEIJO MUÇARELA

O queijo é um dos mais antigos alimentos preparados que a história da humanidade registra. Desde o reinado dos Césares, o queijo tomou uma parte significativa na alimentação dos povos italianos e acredita-se que na Itália são produzidas, anualmente, 900.000 toneladas de queijos com mais de 100 diferentes tipos de sabores e perfumes tão peculiares quanto atraentes, dos mais fortes aos mais suaves, os queijos italianos encantam paladares do mundo inteiro. (ITALIAOGGI, SD).

A produção de muçarela com leite de vaca teve início no Brasil na segunda metade do século XVIII com a colonização portuguesa. Durante a corrida do ouro nas serras mineiras o leite produzido pelos rebanhos destinados à alimentação dos colonizadores passou a ser utilizado nas fazendas para produção de queijo. Com a vinda dos imigrantes italianos, no início do século XX, iniciou-se a produção dos queijos tipo muçarela e parmesão. Mas, apenas em 1920, com a chegada dos primeiros dinamarqueses na região de Minas Gerais, foi que o mercado queijeiro passou a desenvolver-se de maneira acelerada (PRIMO, 1996).

A produção de leite de búfala é completamente absorvida pelo mercado interno brasileiro, sendo utilizada principalmente na fabricação de queijo tipo “muçarela” que é um tipo de queijo tradicionalmente feito a partir de leite bubalino integral e a sua fabricação, de acordo com a tradição italiana, envolve uma técnica artesanal revelando um queijo de massa fresca e sabor característico com alto teor de gordura, o que lhe confere paladar delicado (CARMO, 2006).

Muçarela é um queijo fresco da região da Campânia, a princípio produzido com leite de búfala, mas hoje feito em todo o mundo a partir de leite de vaca. Sua fabricação iniciou-se por volta do século XVI. Uma boa muçarela deve possuir uma crosta fina, consistência semi-dura, textura compacta, fechada, coloração esbranquiçada, odor suave e sabor ligeiramente ácido e salgado. É um queijo coalhado, para ser consumido

fresco, fatiável, com textura firme, sabor e aroma que lembram o leite de que é feito. É indispensável na preparação de pizzas e lasanhas (ALBUQUERQUE, 2003).

Além deste queijo, o leite bubalino é utilizado na fabricação de outros derivados, tais como queijo tipo minas frescal, provolone, ricota, manteiga, requeijão, doce de leite e iogurte (BERNARDES, 2007).

A Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) lançou em 2000 um selo de pureza para a muçarela de búfala produzida no país com a finalidade de garantir a autenticidade do produto devido a mistura com o leite de vaca. Para se obter este selo na embalagem e garantir a comprovação da pureza, o produto deverá ser submetido a análises laboratoriais, como o método baseado na eletroforese e cromatografia, com maior destaque para a técnica de IEF (gel electrofocusing) (MOIO et al., 1989) e o HPLC (High-performance liquid chromatography) indicada por (ADDEO et al. 1995; CATINELLA et al. 1997; OTAVIANO, 2005).

Segundo a Mintel (Principal agência de inteligência de mercado do mundo), o mercado brasileiro de queijos, que cresceu em volume 9,4% ao ano e em faturamento total 7,7% ao ano no período de 2006 a 2013, deverá aumentar seu ritmo de crescimento até 2017. A projeção da empresa de pesquisa é de que os volumes vendidos cresçam, em média, 11,4% ao ano entre 2014 e 2017, e os valores anuais de venda 11,1% ao ano, no mesmo período (Figura 3).

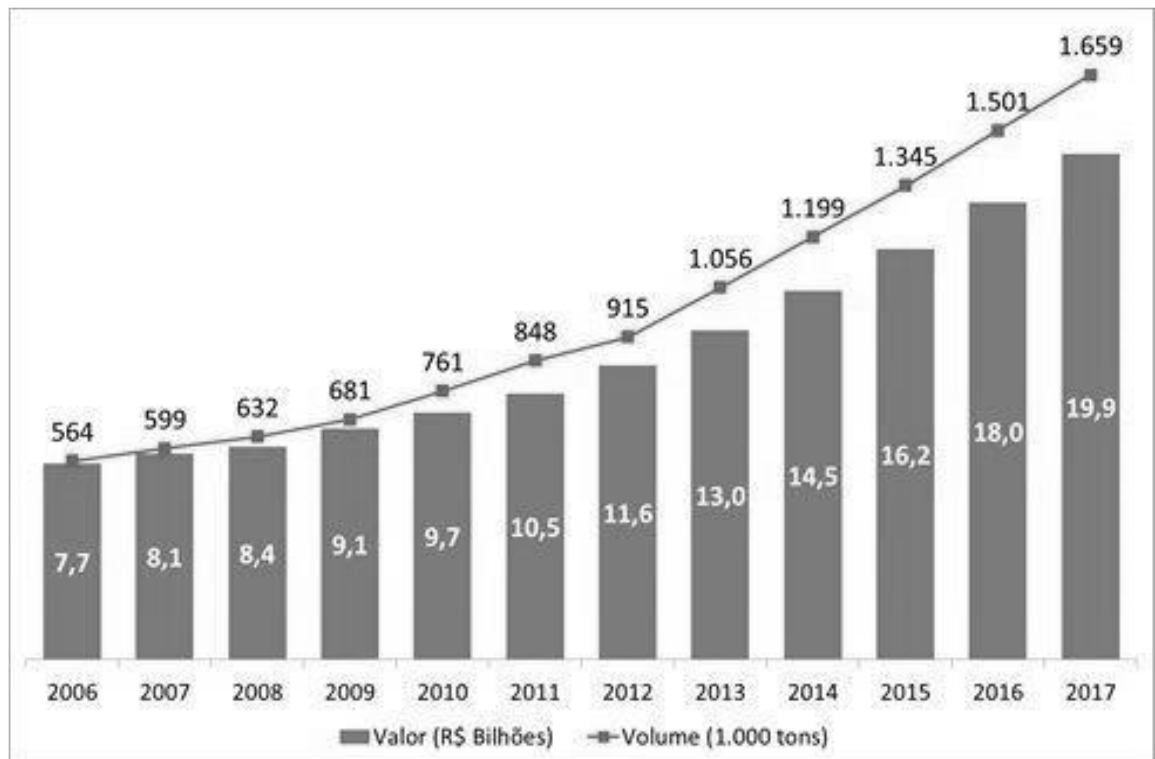


Figura 3 - Tamanho do mercado de queijos no Brasil (Volume e Valor) e projeções até 2017. Fonte: Dados relatório da Mintel.

2.6 RENDIMENTO DO QUEIJO MUÇARELA DE BÚFALA

Diferentes tipos de queijo requerem uma técnica de produção específica, sendo que quando processados a partir do leite de búfala geralmente apresentam um maior rendimento. Além dos queijos, também se produz outros lácteos com o leite bubalino, como o iogurte e o doce de leite, e outros (VERRUMA et al., 2000; CUNHA NETO, 2005; SILVA et al., 2005). Apresentam ótima qualidade nutricional, devido ao seu maior teor de cálcio e vitamina A (TEIXEIRA et. al., 2005). Para a fabricação de um bom produto é necessária uma boa qualidade de matéria prima.

O leite com alta contagem microbiológica altera a coagulação da massa e conseqüentemente a textura do queijo. Essa alteração na formação do queijo se reflete diretamente no rendimento da produção, que apresenta uma grave diminuição. A durabilidade e as características organolépticas (como o sabor) do queijo também ficam

prejudicados, fazendo com que o consumidor não seja fiel ao produto (AMANTE et al., 2001).

O rendimento de cada queijo (tradicional e com Extrato Hidrossolúvel de Soja - EHS) foi estimado de duas maneiras; 1) em litros de leite necessários para a elaboração de um quilo de queijo (L/kg). Neste caso, dividiu-se o volume de leite empregado pela soma da massa dos queijos obtidos (Equação 1) (ROSSI, 1998). 2) em gramas de sólidos totais de queijo por litro de leite (g ST/L), (SABOYA et. al., 1998).

Equação 1.

$$R \text{ (g ST/L)} = \frac{P \times ST \times 1}{V}$$

R = rendimento; P = quilos de queijos obtidos; ST = percentagem de extrato seco dos queijos; V = volume de leite utilizado

O rendimento industrial da produção de derivados de leite bubalino no Brasil está diretamente ligado ao teor de sólidos do leite, em especial, aos teores de gorduras e proteínas. Na fabricação da muçarela de búfala estima-se que, para um rendimento otimizado, a relação entre os teores de gordura e proteínas no leite deve se apresentar próxima a 2:1 (CAMPANILE et al., 2007). Segundo Di Palo (1992), o teor mínimo ideal de gordura no leite para a produção do produto nos padrões usuais da Itália deve ser de pelo menos 7,2%. O rendimento de fabricação naquele país, onde o produto fabricado é usualmente bastante úmido e macio, pode ser calculado em função dos teores de proteínas e gordura do leite através da equação 2.

Equação 2.

$$\text{Rend. muçarela} = ((3,5 \times \%P \text{ no leite}) + (1,25 \times \%G \text{ no leite})) - 0,088$$

P= % de proteínas no leite; G= % de gordura no leite

Dessa maneira, o leite com 7,67% de gordura e 4,37% de proteína com leite da primavera (Tabela 1) resultaria num rendimento em sua transformação em muçarela de $(3,5 \times 4,37) + (1,25 \times 7,67) - 0,088 = 24,79\%$, ou seja, com 100 litros deste leite, se

produz 24,79 kg de muçarela no padrão italiano (4,0L de leite por kg de muçarela). Já com o leite de inverno (Tabela 1), com 6,85% de gordura e 4,02% de proteína, o rendimento seria de 22,54% (4,4L de leite por kg de muçarela), ou seja, para obtenção de 1 kg de muçarela, neste caso, seriam necessários 10% mais leite (DI PALO, 1992).

Tabela 1. Valores médios dos componentes e da contagem de células somáticas (CCS) de leite de búfalas da Região do Alto São Francisco – MG.

Estação do ano	Gord. (%)	Prot. (%)	Lactose (%)	Extrato seco total (%)	CCS mil células/ml
Outono	6,68 _{bc}	4,18 _c	4,96 ^a	17,09 _b	33 _a
Inverno	6,85 _b	4,02 _d	4,93 ^a	17,03 _b	17 _b
Primavera	7,67 _a	4,37 _b	4,82 _b	18,10 _a	8 _c
Verão	6,42 _c	4,52 _a	4,94 ^a	17,06 _b	38 _a
Media	6,90	4,27	4,91	17,32	24

Fonte: Amaral (2004), a, b, c, d Médias dentro da mesma coluna com diferentes letras, diferem estatisticamente (P<0,05).

Quanto ao rendimento bruto dos queijos muçarela avaliados e relatados na literatura, estima-se necessário aproximadamente 5 litros de leite de búfala para se produzir 1,0 kg de queijo muçarela (SILVA et al., 2005). De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Búfalo, são necessários de 6 a 7 litros de leite de búfala para produzir 1,0 kg da muçarela de búfala (ABCB, 2010).

2.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE SEGUIDA DE DETECÇÃO DE POLIMORFISMO DE TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (PCR-RFLP)

No Brasil, as características produtivas e reprodutivas dos bubalinos vêm sendo estudadas (CASSIANO et al., 2004; TONHATI et al., 2002), no entanto ainda são raros os trabalhos com marcadores bioquímicos e moleculares na espécie bubalina. Del Lama e Zago (1996), utilizando marcadores bioquímicos para comparar bubalinos do grupo Murrah com zebuínos das raças Gir e Nelore, por meio dos locos k-caseína e da β -lactoglobulina, observaram variação genética nas raças bovinas, não tendo

encontrado polimorfismos na espécie bubalina. Iorio et al. (2004) estudaram parâmetros de diversidade genética em duas populações de búfalos de regiões distintas do Sul da Itália, utilizando marcadores bioquímicos e moleculares e não verificaram diferenças genéticas significativas entre elas.

Dentro de uma mesma espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na seqüência do DNA. O polimorfismo genético ocorre quando diferentes formas alélicas de um mesmo locus gênico podem ser observadas na frequência de pelo menos 1% em uma população (WATSON; BERRY, 2006). Desta forma podem atuar como marcadores genéticos que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles (*linkage*).

Existe uma diversidade de técnicas utilizadas em Biologia Molecular disponíveis para detecção de variabilidade genética quando se trata de sequenciamento de DNA ou identificação de polimorfismo genético. Por intermédio da utilização de enzimas de restrição, foi desenvolvida a técnica de análise de Polimorfismos do Comprimento do Fragmento de Restrição de DNA (Restriction Fragment Length Polymorfism - RFLP) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), técnica em que os organismos podem ser diferenciados pela análise de padrões derivados da clivagem do seu DNA.

Nesta técnica o primeiro passo para uma análise de PCR-RFLP é a amplificação de um fragmento genômico contendo ou não variação, seguido por tratamento do fragmento amplificado com uma enzima de restrição apropriada. As seqüências nucleotídicas são específicas para cada enzima que clivada do DNA. E assim sendo, a presença ou ausência do reconhecimento das enzimas de restrição resulta na formação de fragmentos de restrição de diferentes dimensões, a identificação dos alelos pode ser feita por eletroforese (RASMUSSEN, SD).

Variações detectadas pela técnica RFLP decorrem de mutações simples, rearranjos dos segmentos de DNA, deleções, inserções ou translocações e

recombinação (Polimorfismos de tamanho). Essas modificações podem ocasionalmente alterar a seqüência ou substituir bases nitrogenadas em um ou mais sítios de reconhecimento de uma determinada enzima (Figura 4) (SCOTT et al. , 2000; CAIXETA et al. , 2009).

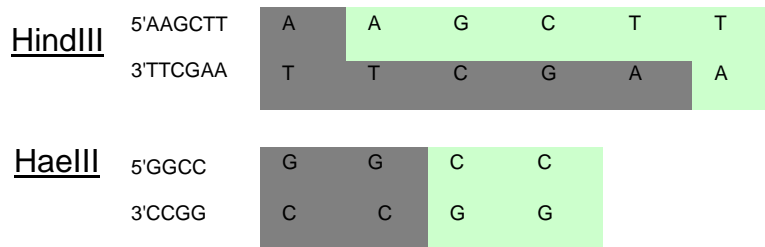


Figura 4 - Ponto de corte das enzimas de restrição utilizadas. Fonte: New England Biolabs.

Em Bovinos, o polimorfismo genético com relação às proteínas lácteas, em particular kappa-caseína (k-CN) e beta-lactoglobulina (β -LG), tem sido associado a diferenças na composição, características de processamento e qualidade do leite, além de parâmetros de produtividade (LIN et al., 1986; ALEANDRI et al., 1990; FOX; MCSEWEENEY, 2003).

Diversos autores citam os búfalos como grande opção econômica e discutem as diversas formas de manejo, criação e melhoramento genético, inclusive o uso da genética molecular como ferramenta para o melhoramento e associação de genes com as características produtivas e tecnológicas do leite (MACEDO et al.; 1995; DEL LAMA; ZAGO, 1996; TIWANA; DHILLON, 1996; YOUSSEF e KHATTAB, 1997; LARA, 1998; ROSATI; VAN VLECK, 1998; TONHATI et al., 1998; VASCONCELLOS ; TONHATI, 2002; ROSATI; VAN VLECK, 2002; SENA et al., 2003; ALBUQUERQUE et al., 2005; BARBOSA et al., 2006; SENO et al., 2006; MALHADO et al., 2007).

2.8 KAPPA CASEÍNA

A κ -CN foi analisada pela primeira vez por Zittle e Custer (1966) e sua seqüência de 171 aminoácidos (aa) foi determinada posteriormente por Mercier et al. (1976 ab).

Devido a modificações pos-transcricionais, a κ -caseína bovina apresenta numerosas variantes genéticas já identificadas (A, B, C, E, F, G, H, I e J), sendo que A e B são as mais comumente encontradas (FOX e McSWENEEY, 2003). Em outro estudo com bovinos, (KAMINSKI, 1996; BARROSO et al., 1998), foram observadas seis variantes alélicas do gene da κ -CN A, B, C, E, F e G, sendo que a κ -CN consiste de 169 aminoácidos com regiões variáveis nos codons 136 e 148 do éxon 3. A variante A contém treonina no códon 136 (ACC) e ácido aspártico em 148 (GAT) e a variante B contém isoleucina (ATC) e alanina (GCT). Yahyaoui et al. (2003) estudando o gene da κ -caseína (CSN3) observaram 5 éxons, estando a região codificante para a proteína contida nos éxons 3 (9 aa) e 4 (171 aa). Por sua vez, o éxon 4, contém uma região de 459 pares de bases (pb), que é responsável pela maior parte da região codificante para a proteína κ -CN (141 aa de um total de 171 aa).

Comparando os genótipos do tipo A e a do tipo B, este último tem maior teor de proteína, maior estabilidade ao calor e congelamento, redução do tempo de coagulação, coalho mais consistente e mais 5-10% do rendimento de queijo (BARROSO et al., 1998). O genótipo BB da κ -Cn determina uma melhor propriedade do leite para a produção de queijo (VIANA, et al., 2001). Em particular, o genótipo BB está associado com o coalho mais firme, com redução do tempo necessário para a formação do coalho e com maior rendimento da produção de queijo. A produção de queijo é baseada na clivagem do peptídeo Phe-Met (fenilalaninametionina) da κ -CN por enzimas ou pelo calor (ANGIOLILLO et al., 2002).

As caseínas encontram-se dispersas no leite e estão organizadas na forma de micelas, compostas de α s1-caseína, α s2-caseína, β -caseína e fosfato de cálcio coloidal. A κ -caseína, única entre as caseínas que não precipita na presença do íon cálcio, encontra-se na superfície externa da micela, exercendo efeito protetor sobre as demais caseínas. Por meio da ação de enzimas proteolíticas, ocorre a hidrólise das ligações 105 e 106 da κ -CN (Figura 5), desestabilizando-a e expondo as demais caseínas aos íons de cálcio. A quebra desse efeito protetor permite a fabricação de queijos e, dessa forma, a maior ou menor concentração de caseína e glóbulos de

gorduras retidos na coalhada irá determinar o maior rendimento do produto. Mediante essas informações a caseína apresenta maior teor em relação ao leite de búfala e, assim sendo, o queijo muçarela elaborado com leite bubalino possui maior rendimento industrial (FARKYE, 2004).

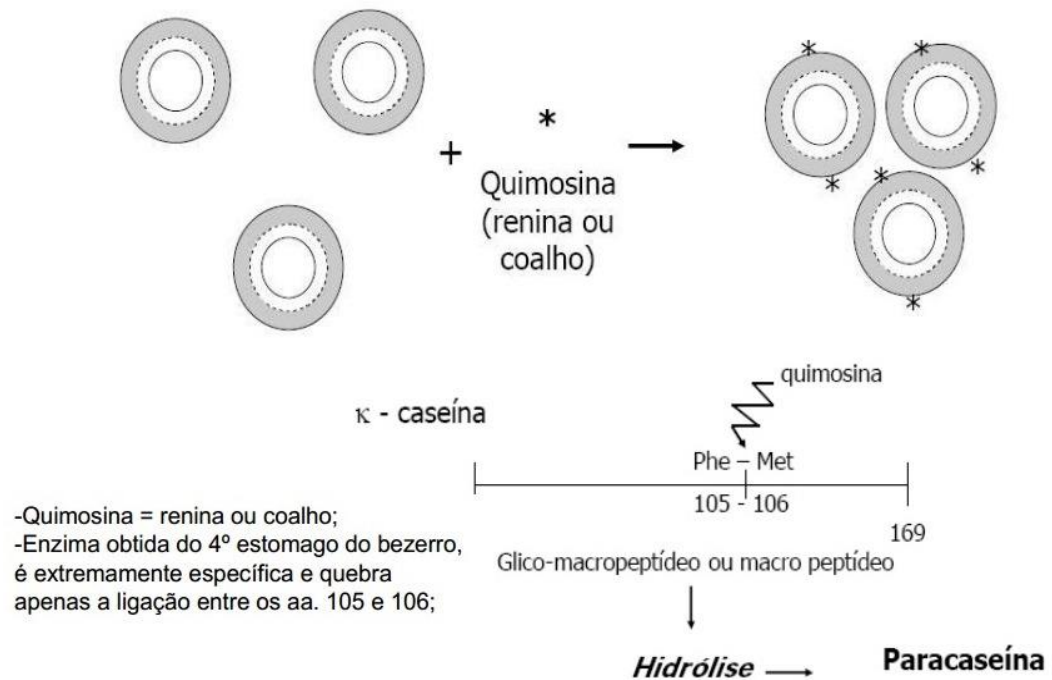


Figura 5 – Coagulação enzimática no processo de fabricação dos queijos: Fonte:

http://www.farmacia.ufrj.br/consumo/disciplinas/t_qb_kit_ponto_isoeletrico_e_coagulacao_de_pr_oteinas.pdf

De acordo como esas informações fica demonstrado que a utilização do leite de búfala, o qual apresenta maior teor de caseína, possui maior rendimento industrial na produção de queijo muçarela.

2.9 BETA LACTOGLOBULINA

Estudos sobre os genes das proteínas do leite, tais como Kappa-caseína e Beta-lactoglobulina estão associados com o desempenho da produção de leite e têm uma grande influência sobre a composição e as propriedades de processamento do leite (NG-KWAI-HANG et al., 1997; MEIGNANALAKSHMI; MAHALINGA NAINAR, 2009). A

β -Ig está situado no cromossoma bovino 11, codifica para um polipéptido de cadeia única de 18 kDa, que compreende de 162 aminoácidos e ocorre em diferentes formas alélicas (MEIGNANALAKSHMI; MAHALINGA NAINAR, 2001).

Beta-lactoglobulina é a mais abundante proteína de soro encontrada no leite dos ruminantes sendo também um dos genes importantes que podem afetar características economicamente importantes no gado (BADOLA et al. 2003; TSIARAS et al., 2005).

O polimorfismo do gene da Beta Lactoglobulina foi descoberto em 1955 (ASCHAFFENBURG; DREWRY, 1955) e são conhecidos um total de 15 alelos, estando cinco destas variantes (A, B, C, D e E) bem identificadas (ORNER; ELMACI, 2006; WALSTRA et al., 2006; MATEJICEK et al, 2007; MEZA-NIETO et al, 2007). Os alelos comuns são A, B, C, D e E, sendo os alelos A e B os mais frequentes. Estas duas variantes de proteína têm pequenas diferenças químicas entre elas, como por exemplo, os aminoácidos aspartato 64 e valina 118 na variante A foram substituídos por glicina e alanina, respectivamente, na variante B (RACHAGANI et al., 2006).

Vários estudos foram realizados para investigar o efeito de genótipos β -Ig na produção, composição e qualidade do leite. Foi descoberto que o genótipo AA de β -Ig teve um efeito favorável sobre a produção de proteína e uma associação significativamente maior no teor de gordura, proteína, caseína, proteína verdadeira, e sólidos totais em comparação com a variante BB (MATEJICEK et al. , 2007; MEZA-NIETO et al, 2010).

Em Bubalinos a β -Ig possui um fragmento de 247 pb e está localizada no éxon IV, e a análise da técnica de PCR-RFLP utilizando enzimas de restrição do tipo Hae III tem tido sucesso em estudos de polimorfismo genético em bovinos (BADOLA et al. 2003, 2004). O polimorfismo genético não foi encontrado em vários estudos com β -Ig de búfalos da raça Murrah na Índia (MEIGNANALAKSHMI; MAHALINGA NAINAR , 2009).

Em bovinos o gene de β -lg consiste em 897 pares de bases (pb) e é localizado no cromossomo 11 (EGGEN, SD). As diversas variantes diferem umas das outras por substituições de um ou mais aminoácidos na sequência de proteína e as variantes mais encontradas são: A e B (CREAMER, 2004). O alelo C incomum foi encontrado em Jersey (australiano e alemão), a variante D foi observada em outras raças (Simental, italiana Brown, Reggiana, Modenese, Modicana, Rendena) e as variantes E, F e G até agora só foram encontradas no sudeste asiático, chamado de gado Bali, Banteng ou *Bos javanicus* (FORMAGGIONI, 1999; NG-KWAI-HANG, 2003; CREAMER, 2004).

Aschaffenburg e Drewry em 1955, argumentaram que a β -lg foi a primeira proteína láctea na qual o polimorfismo foi detectado e desde então, foram descobertos polimorfismos nos genes que codificam as caseínas e grande parte das principais proteínas do soro do leite bovino, representando cerca de 50% das proteínas do soro e 12% do total de proteína no leite. Dentre as cinco variantes genéticas principais, A, B, C, D e E, da β -lg em bovinos, A e B são as mais frequentes, apresentando uma molécula com 162 aminoácidos com peso molecular de 18,4 kDa (KONTOPODIS, 2004). A variante A possui ácido aspártico na posição 64 e valina na 118, enquanto a variante B apresenta glicina e alanina nessas posições (FOX; MCSWENEEY, 2003). Desde a descoberta dos alelos A e B desta proteína, o polimorfismo genético tem sido foco de investigações por sua relação com características de composição e tecnológicas do leite (ORNER; ELMACI, 2006; WALSTRA et al., 2006).

A β -lg não está presente em leite humano e de roedores, por exemplo, e embora sua função biológica ainda não esteja bem estabelecida, acredita-se que ela tenha um papel no metabolismo do fosfato nas glândulas mamárias e no transporte da vitamina A e outras moléculas hidrofóbicas (ácidos graxos) no trato intestinal de neonatos. Essa proteína é sintetizada em células epiteliais da glândula mamária sob regulação da prolactina (KONTOPODIS, 2004).

Foi constatado que β -lg tem redução na concentração no soro lácteo em búfalas de todos os grupos entre a fase inicial e a fase intermediária da lactação, seguida de

aumento no soro lácteo das búfalas primíparas (G1) e com mais de três lactações (G3) na fase final da lactação. Foi também observada uma diminuição da concentração desta proteína no soro lácteo das búfalas com duas a três lactações (G2) (RAIMONDO, 2013), assim como constataram diminuição da concentração desta proteína no soro lácteo de fêmeas bovinas ao longo da lactação.

Diante disso, faz-se necessário estudos que avaliem o perfil genético de búfalas no sentido de melhorar a produção e rendimento do queijo muçarela pela indústria rural.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB - Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. São Paulo, 1960. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/racas.html>. Acesso em 24/01/2017.

ABCB - Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. São Paulo, 2000. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/abcb.html>. Acesso em 24/01/2017.

ABCB - Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/abcb.html>. Acesso em 24/01/2017.

ABCB - Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/murrah.html>. Acesso em 26/01/2017.

ADDEO, F.; GARRO, G.; INTORCIA, N.; PELLEGRINO, L.; RESMINI, P.; CHIANESE, L. Gel electrophoresis for the detection of casein proteolysis in cheese. *Journal Dairy Science*. 62(2): 297-309. 1995.

ALBUQUERQUE, L.C. Os queijos no mundo. Juiz de Fora: ILCT, 2003. v.5.

ALBUQUERQUE, M.S.M.; EGITO, A.A.; MARQUES, J.R.F. et al. Variabilidade genética em búfalos determinada por marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 4, p. 623-628, 2005.

ALEANDRI, R.; BUTTAZZONI, L.G.; SCHNEIDER, J.C. et al. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese producing ability. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.241-255, 1990.

AMANTE, L. de R. C. et al. Valutazione dei punti critici della mungitura in aziende di bufale di pianura e di collina del basso Lazio. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BÚFALE, 1, 2001, Salerno. *Annali...* Salerno: [s.n.], 2001. p. 251- 255.

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. C.; SILVA, N.; BRITO, J.R.F.; SOUZA, G. N. S. Composição e Contagem de Células Somáticas em Leite Bubalino na Região do Alto São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Anais I^oILC1*. 2004.

ANGIOLILLO, A.; YAHYAOU, M. H.; SÁMCHES, A.; PILLA, F., FOLCH, J. M. Characterization of a new genetic variant in the caprine k-casein gene. *J. Dairy Sci.* v.85.p. 2679-2680. 2002.

ANUALPEC 2009: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP Consultoria/Agros Comunicação, 2009. 400 p.

ARAÚJO, Thalita Polyana Monteiro et al. Influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 7, n. 1, p. 01-05, 2011.

ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk. *Nature*, v.176, p.218-219, 1955.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. *Biotechnologia industrial*. São Paulo: Blucher, 2001, p.225-251.

BADOLA S., BHATTACHARYA TK, BISWAS TK, SHIVAKUMAR BM, KUMAR P., MISTRA SS E SHARMA A. (2003). Polimorfismo do gene da beta-lactoglobulina de Bubaline: Um contraste de sua contrapartida bovina. *Buffalo J.* 19 (4), 291-298.

BADOLA, S., BHATTACHARYA, T. K., BISWAS, T. K., SHIVAKUMAR, B. M., KUMAR, P. AND SHARMA, A. (2004). A comparison on polymorphism of Beta-Lactoglobulin gene in *Bos indicus*, *Bos Taurus* and Indicine X Taurine crossbred cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 17 (6) : 733-736.

BARBOSA, S.B.P.; LOPES, C.R.A.; PEREIRA, R.G.A. et al. Environmental and inherited factors as sources of variaton in buffalo birth weight. In: *World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 8, Belo Horizonte: MG, 2006. *Proceedings....* Belo Horizonte: UFMG, 2006.

BARROSO, A; DUNNER, S; CAÑÓN, J. (1998) Technical note: Detection of Bovine Kappa-casein variants A, B, C, y E by Means of Polymerase Chain Reaction-single strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). *J. Anim. Sci.* 76:1535-1538.

BERNARDES, W. Bubalinocultura leiteira no Brasil tendências, parcerias e fomento. Fazenda Paineiras da Ingaí, 1997. Disponível em: <http://www.ingai.agr.br/x/parceria.htm> Acesso em 23 jun. 2017.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, jul./set. 2007.

BHATIA KL, VALSA C. Changes in buffalo lactoferrin level in milk during lactation. In: *World Buffalo Congress*, 4, 1994, São Paulo, SP. *Proceedings...* São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1994a. p.159- 161.

BHATIA KL, VALSA C. Lactoferrin level in buffalo milk. In: *World Buffalo Congress*, 4, 1994, São Paulo, SP. *Proceedings...* São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1994b. p.162-164.

BORGES, K. C.; MEDEIROS, A. C. L.; CORREIA, R. T. P. Iogurte de leite de búfala sabor cajá: caracterização físico-química e aceitação sensorial entre indivíduos de 11 a 16 anos. *Alimentos e Nutrição*, Marília, v. 20, n. 2, p. 295-300, 2009.

BUTLER JE. Immunoglobulins and immunocytes in animal milks. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienestock J, McGhee JR (Ed.). *Mucosal immunology*. New York: Academic Press, 1999. p.1531-1554.

- BUZI, K.A.; PINTO, J.P.A.N.; RAMOS, P.R.R.; BIONDI, G.F. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo muçarela elaborado a partir de leite de búfala. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v.29, n.1, p.7-11, jan. / mar. 2009.
- CAIXETA, E. T. et al . Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). *Marcadores moleculares*. 2. ed. Viçosa: UFV, p. 11 – 93, 2009.
- CAMPANILE, G.; BERNADES, O.; BASTINETTO, E.; BARUSELLI, P.S.; ZICARELLI, L.; VECCHIO, D. Manejo de búfalas leiteiras. Associação Brasileira de Criadores de Búfalas (ABCB). *Buffalotec*. São Paulo, 2007.
- CARMO, C.M. Obtenção do shelf life em queijo mozzarella baseado na avaliação quantitativa e qualitativa dos grupos coliformes e estafilococos. 2006, 108 f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- CASSIANO, L. A. P. et al. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília, 2004. v. 39, n. 5, p. 451-457.
- CATINELLA, S.; TRALDI, P.; PINELLI, C.; DALLATURCA, E.; MARSILIO, R. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in milk science. *Rapid Common Mass Spectrometry*, v.11, n.3, p.330, 1997.
- CREAMER, L. NILSSON, H. PAULSSON, M. COKER, C. HILL, J. JIMENEZ-Flores, R. Efeito da variação genética na hidrólise trípica de bovinos b- lactoglobulina A, B e C. *J. Dairy Sci.* 87: 4.023-4.032. 2004.
- CUNHA NETO, O.C.; OLIVEIRA C.A. F; HOTTA, R.M.; SOBRAL, P.J.A. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v.25, n.3, p.448-453, jul./set. 2005.
- DE KRUIF, C. G. HOLT, C. Casein Micelle Structure, Functions and Interactions *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1, Proteins, Third Edition A, Chapter 5* Ed. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney Kluwer Academic, New York, 2003.
- DEL LAMA, S.N.; ZAGO, M.A. Identification of the k-casein and B-lactoglobulin genotypes in Brazilian *Bos indicus* and *Bubalus bubalis* populations. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 19, n. 1, p. 73-77, 1996.
- DI PALO, R. *Produzione Lattea Nella Búfala con Diete Tradizionali e con L'impiego di Acidi Grassi – Tesi di dottorato di ricerca* , Facoltà di Medicina Veterinaria, Napoli 1992.
- DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. Manejo sanitário animal. Rio de Janeiro: EPUB, 2001. p. 224.
- EGGEN A. FRIES, R. Um intregated mapa citogenética e meiótica do genoma bovino. *Anim. Genet* . 26: 216-236 , S/N.

EL-SALAM, M.H.A; EL-SHIBINY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Science and Technology*, v.91, p.663-699, 2011.

EMMONS, D. B., & MODLER, H. W. (2010). Invited review: a commentary on predictive cheese yield formulas. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5517-5537.
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3262>. PMID: 21094725.

FAO. Food and Agriculture Organization, (2000). O búfalo. Brasília: Ministério da Agricultura; Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos São Paulo.

FAO. Food and Agriculture Organization, (2006). O búfalo. Brasília: Ministério da Agricultura; Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos São Paulo.

FAO. Food and Agriculture Organization, (2013). O búfalo. Brasília: Ministério da Agricultura; Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos São Paulo.

FAO. Food Agriculture Organization, (2014). Disponível em: < <http://faostat.fao.org>>. Acesso em 21 de janeiro de 2017.

FARKYE, NANA. Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, v.57, n.2/3, p.91-98, mai./ago. 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA D. (1998). Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 3a edição.

FORMAGGIONI, P., VERÃO, A. MALCARNE, M. MARIANI, o polimorfismo da proteína P. Leite: detecção e difusão das variantes genéticas em bos género. 1999 Univ Studi di Parma Um degli della Vet facoltà di Med.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. *Advanced dairy chemistry: proteins*. 3ed. New York: Kluwer Academic, 2003. v1.

HARNULV, B. G., AND C. KANDASAMY. 1982. Increasing the keeping quality of milk by activation of its lactoperoxidase system. Results from Sri Lanka. *Milchwissenschaft* 37:454-457.

HOLT, C.; CARVER, J. A.; ECROYD, H. W. Invited review: Caseins and the casein micelles: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal Dairy Science*, v. 96, p. 6127-6146, 2013.

HÜHN, S. (1986) Aproveitamento do leite de búfala em produtos derivados. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, v. 5, Belém.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (2014). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>. Acesso em 21 de Janeiro de 2017.

IORIO, M.; VINCENTI, D.; ANNUNZIATA, M.; RULLO, R.; BONAMASSA, R.; DI LUCCIA, A.; PIERAGOSTINI, E. Biochemical and molecular investigations on qualitative and quantitative Hb polymorphism in the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) population reared in Southern Italy. *Genetic and Molecular Biology*, v.27, p.167-173, 2004.

ITALIAOGGI. Disponível em:

<http://www.italiaoggi.com.br/gastronomia/saibamais/ita_gastro_saibamais56.htm. >
Acesso em 04/02/2017.

KAMINSKI, S. Bovine k-casein gene: molecular nature and application in dairy cattle breeding. *Journal of Applied Genetics*, v.37, p.179-196, 1996.

KIPLAGAT, S. K.; LIMO, M. K.; KOSGEY, I. S. Genetic improvement of livestock for milk production. Intech, 2012.

KISS, J. Perspectivas otimistas para a criação de búfalos no país. *Valor Econômico. Pilar do Sul*, 2012.

KONTOPODIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited Review: beta-lactoglobulin: Binding properties, structure and function. *Journal of Dairy Science*, v.87, n. 4, p.785-796, 2004.

KUMAR R, BHATIA KL. Lactoperoxidase activity in buffalo milk and whey In: *World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo, SP. Proceedings...* São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1994. p.168-170.

LARA, M.A.C. Variabilidade genética em bovinos e bubalinos através de polimorfismos protéicos: análise populacional e suas implicações no melhoramento. Ribeirão Preto: Departamento de Genética, 1998. 215p. Tese (Doutorado) - FMRP/USP.

LENSTRA, J. A.; BRADLEY, D. G. Systematics and phylogeny of cattle. In: FRIES, R.; RUVINSKY, A. *The genetics of cattle*. New York: CAB International, 1999. cap 1, p. 1-14.

LIN, C.Y.; McALLISTER, K.F.; NG-KWAIHANG, K.F. Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.69, p.704- 712, 1986.

LIRA, H. DE L.; SILVA, M. C. D.; VASCONCELOS, M. R. DOS S.; LIRA, H. DE L.; LOPEZ, A. M. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. *Cien. Tecnol. Alimen.* v.29, p.33-37, 2009.

MACEDO, M.P.; SOUZA, J.C.; RAMOS, A.A. et al. Efeitos ambientes e genéticos sobre o peso aos 210 dias de bezerros bubalinos da raça Mediterrânea. In: *REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 32, Brasília: DF, 1995. Anais.... Viçosa: UFV, p. 723-724, 1995.*

- MAHRAN GA, El-Alamy HA, Mahfouz MB, Hegazi AG, El-Loly MM, El-Kholy AF. Immunoglobulins of buffaloes' milk. In: World Buffalo Congress, 5, 1997, Caserta, Itália. Proceedings... Caserta: [s.n.], 1997. p.13- 16.
- MALHADO, C. H. M.; RAMOS, R. R.; CARNEIRO. P. L. S.; SOUZA. J. C.; PICCININ, A. Parâmetros e tendências da produção de leite em bubalinos da raça Murrah no Brasil. R. Bras. Zootec. v. 36, n. 2, p. 376-379, 2007.
- MALHADO, C.H.; RAMOS, A.A.; CARNEIRO, P.L.S. (2008) Melhoramento e estrutura populacional em bubalinos da raça Mediterrâneo no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.43.
- MATEJICEK, D.; HOUSEROVA, P.; KUBAN, V. Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic-ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments. Journal of Chromatography A, v. 1171, p. 80–89, 2007.
- MEIGNANALAKSHMI, A., MAHALINGA NAINAR, A. & NACHIMUTHU, K. (2001). Identification of genetic polymorphism of beta-lactoglobulin gene locus in Red Sindhi cows by PCR-RFLP Analysis. International Journal of Animal Science, 16, 223-226.
- MEIGNANALAKSHMI, S. & MAHALINGA NAINAR, A. (2009). PCR-RFLP analysis of Beta-lactoglobulin gene in Murrah buffaloes. Tamilnadu Journal of Veterinary & Animal Sciences, 5 (5), 194-197.
- MERCIER, J. C.; ADDEO, F.; PELISSIER, J. P. Primary structure of the caprine caseinomacropeptide. Biochimie, Paris, v. 58, p. 1303-1310, 1976a.
- MERCIER, J. C.; CHOBERT, J. M.; ADDEO, F.; Comparative study of the amino acid sequence of the caseinomacropeptide form seven species. FEBS Letters, Jouy-en-Josas, v.72, p.208-214, 1976b.
- MINTEL. "Pesquisa de Mercado" Mintel relatórios de banco de dados, 2015, Disponível em: <<http://brasil.mintel.com/empresa-de-pesquisa-de-mercado>>. Acesso setembro de 2016.
- MEZA-NIETO, M. A.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; BECERRIL-PÉREZ C. M.; RUÍZ-LOPEZ, F. J.; DÍAZ-RIVERA, P.; VALLEJO-CORDOBA, B. Polimorfismo genético de la β -lactoglobulina en la leche de vacas Holstein y criollo lechero tropical. Agrociencia, México, v. 44, n. 5, ago. 2010.
- MOIO, L.; DI LUCCIA, A.; ADDEO, F. Fast isoelectric focusing of milk proteins on small ultrathin polyacrylamide gels containing urea. Electrophoresis, v.10, n.7, p.533-535, 1989.
- MOZZARELLA DI BUFALA, 2004. Disponível em:<<http://www.mozzarelladibufala.org/>>. Acesso Junho de 2017.

- NARDI JUNIOR, G.; RIBEIRO, M. G.; PAULIN, L.; JORGE, A. M. Brucelose em bubalinos: uma revisão com ênfase ao sorodiagnóstico oficial. *Veterinária e Zootecnia*, v. 19, p. 142-156, 2012.
- NG-KWAI-HANG, K.F. A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition/milk production. *Milk Protein Polymorphism II*, Palmerston North, New Zealand: International Dairy Federation, p. 22-37, 1997.
- NG-KWAI-HANG, K. Grosclaude, F. O polimorfismo genético das proteínas do leite. In: *Advanced Chemistry Dairy - 1 proteínas*. PF Fox. (Ed). Elsevier Applied Science, New York, pp NY.739-773. 2003.
- ORNER, Y.; ELMACI, C. Milk protein polymorphisms in Holstein cattle. *Int. J. Dairy Technol.*, v.59, p.180-182, 2006.
- OTAVIANO, A. R.; TONHATI, H.; SENA, J. A. D.; LIMA, A. L. F.; BOTTGER, G.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A.; CARDONA, H. C. Extração de DNA a partir de queijos mozzarella produzido com leite de búfalas com vistas às provas para a identificação de misturas com leite de vaca. *Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes*, v.60, p3-6, 2005.
- PEARY, J. Y. Revision of buffaloes position on the zoological scale. *Buffalo Bulletin*, v. 9, p. 9-17, 1990.
- PERRY, K. S. P; Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quím. Nova*, vol. 27, n.2, p. 293-300, 2004.
- PRIMO, W.M. Entressafra no Brasil: Meio século de drama. *Indústria de Laticínios*, v.1, n.2, p.12-14, 1996.
- PUVOGEL G, Baumrucker CR, Sauerwein H, Ruhl R, Ontsouka E, Hammon HM, Blum JW. Effects of an enhanced vitamin A intake during the dry period on retinoids, lactoferrin, IGF system, mammary gland epithelial cell apoptosis, and subsequent lactation in cows. *J Dairy Sci*, v. 88, p.1785-1800, 2005
- RACHAGANI, S.; GUPTA, I.D.; GUPTA, N.; GUPTA, S. Genotyping of beta-lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. *BMC Genetics*, v.7, 2006.
- RAIMONDO R.F.S., MIYASHIRO S.I., MORI S.C. & BIRGEL JUNIOR E.H. 2013. Proteínas do soro lácteo de vacas da raça Jersey durante a lactação. *Pesq. Vet. Bras.* 33(1):119-125
- RASMUSSEN, Henrik Berg. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. Denmark: Institute Of Biological Psychiatry, Mental Health Centre Sct. Hans, S/D.

RODRIGUEZ, C.F.C.; IAPICHINI, J.E.C.B.; LISERRE, A.M.; DE SOUZA, K.B.; FACHINI, C.; REICHERT, R.H. Oportunidades e desafios da bubalinocultura familiar da região sudoeste paulista. *Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária*, São Paulo, p.100-109, dez. 2008.

ROSATI, A., VAN VLECK, L. D. Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and mozzarella cheese production in the Italian river buffalo population. In: *WORLD CONGRESS ON GENETIC APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION*, 6, Armidale, Austrália. *Proceedings...* Armidale, 1998, v.24. p.459-462.

ROSATI, A.; VAN VLECK, L.D. Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and Mozzarella cheese production for the Italian river buffalo *Bubalus bubalis* population. *Livestock Production Science*, v. 74, n. 2, p. 185-190, 2002.

ROSSI, D. A. et al. Utilização do coalho bovino e coagulantes microbiano e genético na composição e rendimento do queijo Minas frescal. *Rev. ICLC, Juiz de Fora*, v. 53, n. 305, p. 8-14, set. /dez. 1998.

SABOYA, L. V. et al. Efeitos físico-químicos da adição de leite reconstituído na fabricação de queijo Minas frescal. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, v. 18, n. 4, p. 368-376, out./dez. 1998.

SANTIAGO, A.A. Introdução dos Búfalos no Brasil. *Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos*, 13p.,2000.

SCOTT, K. D. ; ABLETT, E. M.; LEE, L. S.; HENRY, R. J. AFLP markers distinguishing an early mutant of flame seedless grape. *Euphytica*, New York, v. 113, n. 3, p. 245 - 249, 2000.

SENA, L.; SCHNEIDER, M.P.C.; BRENIG, B. et al. Polymorphisms in MHC-DRA and DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. *Animal Genetics*, v. 34, p. 1-10, 2003.

SENO, L.O.; CARDOSO, V.L.; TONHATI, H. Responses to selection for milk traits in dairy buffaloes. *Genet. Mol. Res.*, v. 5, n. 4, p. 790-796, 2006.

SILVA, F. T. Queijo Prato. *Embrapa Informação Tecnológica, (Agroindústria Familiar)*, Brasília, DF. 2005. 54 p.

SOUZA, C.L.; NEVES, E.C.A.; CARNEIRO, C.A.A. (2002). Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na Ilha de Mrajó-PA. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v.20.

TEIXEIRA et. al., Leite de bufala na industria de produtos láceos – *Rev. Bras, Reprod. Anim.* 29, nº 2, p. 96-100, 2005 B. Horizonte.

TIWANA, M.N; DHILLON, J.S. Buffalo improvement in retrospective and prospective. *Journal of Research*, v. 33, n. 1-4, p. 323 - 334, 1996.

TONHATI, H.; VASCONCELLOS, B.F.; WALDIGE, V. et al. Sazonalidade de partos, repetibilidade e fatores que afetam a produção de leite e a duração da lactação em búfalos da raça Jafarabadi. *Veterinária, notícias*, v. 4, n. 1, p. 89-95, 1998.

TONHATI, H. Critérios de seleção para produção total de leite em bubalinos criados no Estado de São Paulo. 2002. 68 f. Tese (Livre Docência), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

TSIARAS, A.M.; BARGOULI, G.G.; BANOS, G.; BOSCOS, C.M. Effect of kappa casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive Performance of Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, v.88, n.1, p.327- 334, 2005.

VASCONCELLOS, B.F.; TONHATI, H. Inbreeding and its effects on some productive and reproductive traits in a Murrah buffalo herd. *Journal Animal Breeding and Genetics*, v. 115, p. 299-306, 1998.

VERRUMA-BERNARDI, M.R.; DAMÁSIO, M.H.; VALLE, J.L.E.; OLIVEIRA, A.J. Elaboração do queijo mozzarella de leite de búfala pelos métodos tradicional e da acidificação direta. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.20, n.2, mai/ago. 2000.

VIANA, J. et al. Análises de los genótipos más frecuentes de la k-caseína em la raza vacuna rubio galega mediante PCR/RFLPs. *Archivos de Zootecnia*, Cordoba, v.50, p. 91-96, 2001.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. Dairy science and technology. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 782p.

WATSON, J.D.; BERRY, A. DNA: the secret of life. New York: Alfred A. Knopf, 2006. 446p.

YAHYAOU, M. H. et al. Characterization and genotyping of the caprine k-casein variants. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 86, p. 2715-2720, 2003.

YOUSSEF, M.M.; KHATTAB, R.M. Prospetive dell'allevamento bufalino in Egitto. *Bubalus Bubalis*, v. 3, n. 1, p. 7-26, 1997.

ZITTLE, C. A.; CUSTER, J. H. Identification of the k-casein among the componentes of whole goat casein. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 49, p.788-791, 1996.

ZETOUNI. L. et al. Effects of a single nucleotide polymorphismin the leptin gene on the 2 productive traits of dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Molecular Biology Reports*. 3. 2013. doi: 10.1007/s11033-013-2618-z.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo caracterizar os genótipos do gene da Kappa-caseína e Beta-lactoglobulina através da técnica de PCR-RFLP em búfalas da raça Murrah no Estado de Pernambuco e correlacionar seus genótipos com a produção e composição do leite e rendimento de queijo muçarela.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair DNA genômico de sangue dos animais (Búfalas);
- ✓ Amplificar o gene da Kapa-caseína e Beta-lactoglobulina com oligonucleotídeos específicos através da PCR (Reação de Polimerização em Cadeia);
- ✓ Identificar o polimorfismo através da eletroforese em gel desnaturante (PCR-RFLP);
- ✓ Identificar as possíveis variações alelicas da Kapa-caseína e da Beta-lactoglobulina em bubalinos.
- ✓ Avaliar a composição do leite e rendimento do queijo de búfala a partir dos genótipos encontrados para Kappa-caseína e Beta-lactoglobulina.



Caracterização dos genótipos da kappa-Caseína e Beta-Lactoglobulina relacionados com produtos lácteos em búfalas Murrah

Journal:	<i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ramalho, Isabella; Universidade Federal Rural de Pernambuco Barbosa, Severino; Universidade Federal Rural de Pernambuco Silva, Diogo; Universidade Federal Rural de Pernambuco Silva, Elizabete; Universidade Federal Rural de Pernambuco Rocha, Arturene; Universidade Federal Rural de Pernambuco Mascena, Luciana; Universidade Federal Rural de Pernambuco Colaço, Tereza; Bupesa wischrall, Aurea; Universidade Federal Rural de Pernambuco Gomes-Filho, Manoel; Universidade Federal Rural de Pernambuco
Keyword:	Candidate genes, genetic polymorphism, milk quality, cheese yield, CCS in buffaloes

SCHOLARONE™
Manuscripts

5. ARTIGO CIENTÍFICO

**COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS KAPPA-CASEÍNA E BETA-LACTOGLOBULINA
COM A COMPOSIÇÃO DO QUEIJO MUÇARELA PRODUZIDO À PARTIR DE LEITE
DE BÚFALAS DA RAÇA MURRAH**

**COMPARISON OF KAPPA-CASEIN AND BETA-LACTOGLOBULIN GENOTYPES
WITH THE COMPOSITION OF MUZZLE CHEESE PRODUCED FROM MILK OF
BUFFALO MURRAH**

Isabella A. Ramalho¹, Severino B. P. Barbosa³, Diogo M.F. Silval², Elizabete C. Silva³, Arturene M. Rocha³, Luciana A. Mascena¹, Tereza H. Colaço⁴, Aurea Wischral², *Manoel Adrião¹.

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Dom Manoel de Medeiros, S/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil.

²Departamento de Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Dom Manoel de Medeiros, S/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil.

³Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Dom Manoel de Medeiros, S/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil.

⁴Veterinária Autônoma.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the polymorphism in the kappa-casein and beta-lactoglobulin genes and to relate the characteristics of milk and mozzarella cheese in Murrah buffaloes. A total of 300 animals were used and all 300 blood samples were submitted to genotyping. For the analysis of the genetic polymorphism by PCR-RFLP technique, 80 animals were selected from a technified farm. After the identification of the genotypes, the same 80 buffaloes producing on average 8l of milk/day were used for analysis of milk composition and production of cheese. In 100% of the analyzed population, the genotypes BB were identified for k-casein and AA for β-lactoglobulin. The combination of these genotypes showed potential for milk production with 6.47% fat, 16.22% total solids and 3.94% protein; sufficient components to produce mozzarella cheese with 4.63% fat, 14.47% total solids and 4.26% protein. The production of cheese, based on the volume of milk (l) and mass of cheese produced (kg), was 5l of milk to 1 kg of mozzarella cheese. In view of the above, the BB and AA genotypes for the k-casein and β-lactoglobulin genes are related to the high quality of the milk and the production of mozzarella cheese in Murrah buffaloes, resulting in a high homozygous and a high monomorphism rate observed in the genetic *loci* analysed.

Key Words: candidate genes, genetic polymorphism, milk quality, cheese production, CCS in buffaloes.

Correspondence: Prof. Dr. Manoel Adrião gomes Filho, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal Aplicada – UFRPE, Recife – PE, República Federativa do Brasil, Tel.: +55-81-30347262, E-mail: manoeladriao@yahoo.com.br.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo nos genes da kappa-caseína e β -lactoglobulina e relacionar com as características do leite e queijo muçarela em búfalos da raça Murrah. Um total de 300 animais foram utilizados e todas as 300 amostras de sangue foram submetidas a genotipagem. Para a realização da análise do polimorfismo genético por meio da técnica de PCR-RFLP, 80 animais foram selecionados de uma empresa rural tecnificada. Após a identificação dos genótipos, as mesmas 80 búfalas, produzindo em média 8l de leite/dia, foram utilizadas para análise de composição de leite e rendimento de queijo muçarela. Em 100% da população analisada foram identificados os genótipos BB para k-caseína e AA para β -lactoglobulina. A combinação desses genótipos apresentou potencial para produção de leite contendo 6,47% de gordura, 16,22% de sólidos totais e 3,94% de proteína; componentes suficientes para produção de queijo muçarela com 4,63% de gordura, 14,47% de sólidos totais e 4,26% de proteína. O rendimento do queijo, baseando-se no volume de leite (l) e massa de queijo produzida (kg), foi de 5l de leite para 1 kg de queijo muçarela. Diante do exposto, os genótipos BB e AA para os genes da k-caseína e β -lactoglobulina, estão relacionados com alta qualidade do leite e rendimento do queijo muçarela em búfalos da raça Murrah, resultando numa alta taxa de homozigose e alto monomorfismo observados nos *loci* gênicos analisados.

Palavras Chaves: genes candidatos, polimorfismo genético, qualidade de leite, rendimento de queijo, CCS em búfalas.

INTRODUÇÃO

A importância dos produtos lácteos para o consumo humano em muitos países está ligada diretamente ao importante papel do desempenho do rebanho bubalino no cenário da produção de proteína de origem animal. Estes animais destinados à atividade leiteira apresentavam em 2000, um rebanho mundial de 47 milhões passando para 59 milhões em 2011, ou seja, um aumento de 25,5%. No mesmo período, a produção mundial de

leite passou de 66,5 para 93 milhões de toneladas de litro, representando um acréscimo de aproximadamente 40% (FAO, 2013).

Nos últimos anos houve um incremento significativo nas pesquisas realizadas em diversos países com objetivo de avaliar a variabilidade em genes codificantes de proteínas do leite (α 1-caseína, α 2-caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina) que apresentam algum efeito na produção e na composição do leite de várias espécies de interesse zootécnico. As proteínas do leite são constituídas por caseínas na forma micelar (α 1-caseína, α 2-caseína, β -caseína e κ -caseína), proteínas solúveis do soro (β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e albumina) e proteínas pouco abundantes, tais como, lactoferrina, imunoglobulinas, glicoproteínas e enzimas (Roncada et al., 2002).

Recentemente, os bubalinos têm recebido bastante atenção nos estudos de polimorfismos genéticos que acarretam variantes nas proteínas do leite Kappa-caseína (κ -cn) e Beta-lactoglobulina (β -lg) por serem considerados animais economicamente superiores aos zebuínos e bovinos. Esses animais são rústicos e apresentam uma longa vida produtiva e reprodutiva dentro do rebanho, garantindo uma redução no custo de produção de leite (Verruma et. al., 1994; Malhado et al., 2008).

A κ -cn está em maior quantidade no leite bubalino e o processo de coagulação é acelerado devido a uma menor quantidade de quimosina para a fabricação de queijos. A β -lg não tem um papel definido na coagulação do leite, mas sua variabilidade protéica, assim como a da κ -caseína, apresenta relações com as características de produção, qualidade e composição de leite, bem como na produção e rendimento de queijos (Walstra et al., 2006; El-Salam; El-Shibiny, 2011).

Para o gene da κ -cn, em bovinos, foram descritas seis variantes genéticas: A, B, C, E, F e G (Angiolillo et al., 2002). A influência destas variantes genéticas pode determinar o tamanho, funções específicas das micelas e sua clivagem pela quimosina, responsável pela coagulação do leite (Yahyaoui et al., 2003), especialmente na fabricação do queijo com alto rendimento. O leite contendo a variante genética B apresenta melhores propriedades lactodinâmicas do que o leite contendo as variantes genéticas A (Rahali; Me'nard, 1991) E (Gravert et al., 1991), ou C (Macheboeuf et al., 1993). Portanto, espera-se que indivíduos com o genótipo BB para κ -cn produzam leite de melhor

propriedade para a produção de queijo (Angiolillo et al., 2002).

Dentre as cinco variantes genéticas principais da β -Ig em bovinos, A e B são as mais frequentes (Fox; McSweneey, 2003; Rachagani et al., 2006). A variante genética B foi reconhecida como superior para a qualidade do leite em raças bovinas europeias, enquanto a variante genética A está associada com parâmetros de rendimento de produtos lácteos (Strazalkowska et al., 2002). A relação dos aspectos fisiológicos e adaptativos é de grande relevância uma vez que os elevados níveis de sólidos totais, gordura, proteína, cálcio e fósforo presentes no leite bubalino quando comparado ao do bovino, apresentam menos água e mais matéria seca que aumentam o rendimento na elaboração de queijos, produtos fermentados e outros (Tonhati et al., 1996). Neste contexto, o trabalho teve por objetivo avaliar o polimorfismo nos genes da κ -cn e β -Ig, características físico-químicas e contagem de células somáticas do leite e queijo muçarela em búfalos da raça Murrah criados no Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais - CEUA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob número de protocolo 23082/006150/2015-54.

Material biológico e amostragem - Para obtenção do DNA genômico, foram coletados 5 mL de sangue total da veia jugular, usando tubos vacutainer contendo 7.5 mg de EDTA, de 300 búfalas adultas da raça Murrah, provenientes de duas propriedades da região da Mata Sul (n=254) e uma propriedade do Agreste Meridional (n=46) do Estado de Pernambuco, Brasil.

Análises moleculares - O DNA genômico foi extraído utilizando kit QIAamp DNA Mini and Blood (Quiagen®) e posteriormente foi avaliado em gel de agarose a 0,8% por 30 min. As regiões analisadas nos genes da Kappa-caseína e Beta-lactoglobulina corresponderam às amplificadas pelos primers 5'CACGTCACCCACACCCACATTTATC-3' e 5'TAATTAGCCCATTTTCGCCTTCTCTGT-3' (Mitra et al., 1998) e 5'-TGTGCTGGACACCGACTACAAAAG-3' e 5'-GCTCCCGGTATATGACCACCCTCT-3' (Karimi et al., 2009), respectivamente. As reações de PCR foram constituídas de 10 μ l de Top Taq MM, 2 μ l de Coraload concentrate 10x, 5,6 μ L de RNase – free water

(TopTaq™ Master Mix kit - Qiagen), 0,2 µl de cada par de primer (10 pmol) e 2 µl de DNA, com um volume final de 20 µl. As condições de PCR foram as seguintes: um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 4 min, seguido por 30 ciclos de 94°C durante 1 min., 56°C durante 2 min. e 72°C durante 1 min e um passo de extensão final de 72°C durante 10 min. Os produtos de amplificação foram corados com Blue Green Dye (LGC Biotecnologia) e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE 1,0 X com corrida a 100 V por 50 min.

Para determinação dos genótipos pela técnica do PCR-RFLP foi realizada a digestão dos produtos de amplificação dos genes da Kappa-caseína e Beta-lactoglobulina em reações separadas utilizando-se as endonucleases Hind III e Hae III (Thermo Scientific), respectivamente. Cada reação foi constituída por 1,0 µl de tampão de enzima, 10 µl de DNA amplificado, 1,0 µl de enzima e 8,0 µl água ultrapura, totalizando 20 µl. As amostras foram incubadas a 37°C durante 3h e inativada a 65°C e 80°C por 20 min. Os produtos da digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (3%), corados com Blue Green Dye (LGC Biotecnologia), em tampão TAE 1,0 X (100 V por 1 h e 30 min.). Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados para avaliação dos produtos da PCR, e os tamanhos dos fragmentos foram estimados usando como referência a migração de um marcador de 50 pb (DNA ladder, 50pb - Qiagen).

Análises da composição do leite - Após a determinação dos genótipos da população em estudo, 80 búfalas com os mesmos genótipos para os genes da Kappa-caseína e beta-lactoglobulina, provenientes de uma empresa rural da região da Mata Sul de Pernambuco que se disponibilizou a participar das análises de composição do leite, foram utilizadas no estudo de análises físico-químicas (teores de gordura total, proteína total, caseína e sólidos totais) e contagem de células somáticas (CCS) do leite. As amostras individuais de leite foram coletadas e transferidas para frascos plásticos de 40 mL contendo o conservante Bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-propanodiol). Após a homogeneização para completa dissolução do conservante, as amostras foram devidamente acondicionadas em recipiente com isolante térmico e enviadas ao Laboratório de Análise de Qualidade de Leite da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PROGENE-UFRPE). A composição do leite foi analisada pelo método de

espectroscopia no infravermelho médio (IDF 1996), utilizando-se o equipamento eletrônico Bentley Combi 2300. Para a CCS (IDF 1995), foi empregado o método de citometria de fluxo por meio do equipamento eletrônico IBC Bentley.

Análises da composição e rendimento do queijo - Para análise de composição e rendimento, o queijo muçarela foi processado a partir da utilização de um pool do leite da ordenha das 80 búfalas citadas anteriormente. O processamento do queijo foi realizado em cinco dias diferentes e, em cada dia, foi obtida uma amostra do queijo para as análises requeridas totalizando cinco amostras. A metodologia utilizada no processamento do queijo muçarela foi de acordo com o fabricante da indústria queijeira, tendo sido utilizados 5 litros de leite para produção de 1kg de massa de queijo. As amostras obtidas do queijo foram analisadas quanto a proteína total, gordura total e sólidos totais segundo as recomendações do (MAPA, 2003). As coletas de leite e queijo foram realizadas no mês de setembro do ano de 2016.

Análises estatísticas. Os dados obtidos da composição do leite e do queijo e do rendimento do queijo muçarela foram avaliados pela estatística descritiva (medias e desvios-padrão) para cada componente analisado. O rendimento do queijo muçarela foi estimado de duas maneiras:

a) rendimento em função dos teores de proteínas (%P) e gordura (%G) do leite utilizando a fórmula descrita por (Del Prato, 1998).

Rendimento do queijo muçarela = $((3,5 \times \%P \text{ no leite}) + (1,25 \times \%G \text{ no leite})) - 0,088$.

b) rendimento baseado no volume em litros de leite necessário para a elaboração de 1 kg de queijo (L/kg).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil genotípico

No presente estudo, os produtos da amplificação para os genes da Kappa-Caseína (κ -cn) e Beta-Lactoglobulina (β -lg) geraram fragmentos com comprimentos de 379 pb e 247 pb, respectivamente. A digestão dos produtos de PCR com a enzima Hind III para o gene κ -cn gerou dois fragmentos: 225 e 154 pb, que correspondeu ao genótipo BB; e a digestão com HaeIII para o gene da β -Lg também gerou dois fragmentos: 148 e 94

pb, que correspondeu ao genótipo AA (Fig. 1). No rebanho estudado da raça Murrah, foram identificados apenas o alelo B para o gene da k-cn e o alelo A para o gene da β -lg.

O tipo de caseína da proteína do leite é um fator importante que afeta a firmeza do coalho, além da qualidade e o rendimento do queijo (Lawrence, 1993). Aleandri et al., (1990), observaram que a firmeza do coalho é um dos principais fatores que podem afetar significativamente a produção de queijo e outro fator é o baixo teor da gordura. Alguns genótipos, tais como o do tipo B da κ -cn, estão diretamente relacionados com o tamanho das micelas de caseína e resulta em melhor formação do coalho. O genótipo BB para a k-cn também foi encontrado por outros autores (Pipalia et al., 2001; Otaviano et al., 2005; Jaayid et al., 2013). Singh et al., (2005), encontraram duas variantes (A e B) para locus de k-cn nas raças Murrah e Bhadawari, porém identificaram a presença de monomorfismo para o genótipo BB em búfalo das raças Surti e Mehsana. Pipalia et al., (2001), na Índia, e Otaviano et al., (2005), no Brasil, também encontraram monomorfismo (BB) para este gene em búfalos.

O genótipo identificado para a β -lg foi AA e foi o mesmo encontrado por Badola et al., (2003); Karimi et al., (2009), para búfalos Murrah e Bhadwari, respectivamente. Vários estudos foram realizados sobre o efeito dos genótipos da β -lg sobre a produção de leite tendo o genótipo AA demonstrado efeito favorável sobre a quantidade de proteínas, rendimento na produção de leite (Bovenhuis et al., 1992) e maior estabilidade térmica do leite (Fox; McSwenney, 2003). Robitaille et al., (2002) observaram que búfalos com o genótipo AA produziram maior proporção de β -lg, menor proporção de α -lactalbumina e uma tendência para diminuir a concentração de caseína no leite em relação aos animais de genótipo BB. Diante do exposto, deve-se considerar que a população pode resultar de acasalamentos endogâmicos, o que resulta em aumento da homozigose e conseqüentemente no monomorfismo observados nos locos gênicos analisados.

Composição do leite e do queijo, CCS, rendimento do queijo

Para o estudo de composição do leite e queijo, foram avaliadas as condições sanitárias das búfalas para que não houvesse interferência na qualidade dos resultados. Dessa

forma, cada animal foi avaliado para a mastite clínica por meio de observação de alterações no leite, pelo teste da caneca telada ou de caneco de fundo escuro, de sinais da inflamação como a presença de dor e edema no úbere e modificação das características da secreção do leite. Para a mastite subclínica, foi realizado contagem de células somáticas (CCS) por citometria de fluxo.

O valor médio de CCS obtido das 80 amostras de leite bubalino foi de 64.323 células/mL. Este valor está de acordo com os valores referenciados como padrão de normalidade do leite de búfalas (Ceron-Muñoz; Tonhati; Duarte, 2002). O resultado apresentado indica a excelente qualidade do leite no que se refere à CCS, o que favorece a sua industrialização para a fabricação do queijo muçarela e ainda pode ser considerado como reflexo do bom estado de saúde do úbere das búfalas do rebanho. Esse parâmetro é de extrema importância para avaliação da qualidade do leite do tanque e para que o produtor obtenha a remuneração adequada pelo produto. Diversos autores encontraram valores médios das contagens de células somáticas no leite normal de búfalas apresentando resultados variáveis entre 50.000 e 375.000 células/mL, com média de 140.000 células/mL (Silva; Silva, 1994), e entre 50.000 e 100.000 células/mL (Galiero; Morena, 2000).

A média encontrada para gordura do leite foi de 6,47% \pm 1,53, valor aproximado aos encontrados por Cunha Neto et al., (2005) entre abril e junho (6,82%), Seno; Cardoso; Tonhati, (2007), entre maio e outubro (6,89%), Costa Filho et al., (2014), na estação seca do ano (5,76%) e Pignata et al., (2015), que obteve média de 4,26%. A maior concentração de gordura no leite de búfalas, durante a época seca, pode ser atribuída a concentração desses componentes na glândula mamária devido a menor produção de leite dos animais nesse período. Porém, vale ressaltar que a gordura se apresenta como o constituinte mais variável no leite e assume valores entre 5,5% e 8,5%, podendo chegar até 15% (Venturini; Sarcinelli; Silva, 2007; Varrichio et al., 2007; Costa Filho et al., 2014). A gordura é o constituinte do leite que apresenta maior valor econômico, sendo utilizada na produção de derivados, contribuindo para o sabor característico e melhorando a textura dos mesmos. Sob o ponto de vista nutricional, os lipídeos apresentam níveis apreciáveis de ácidos graxos essenciais ao organismo (Oliveira, 2004).

Em nossos resultados, no mês de setembro, o teor de sólidos totais do leite foi de $16,22\% \pm 1,59$. Esse valor encontra-se dentro da faixa dos teores sólidos do leite de búfalos que varia de 15% a 17% segundo (Amaral et al., 2005). Putra et al., 2015, avaliando quatro rebanhos distintos entre os meses de julho a janeiro, no Norte de Sumatra, encontrou valores que oscilaram entre 15,70 e 17,88%. Costa Filho et al., 2014, também encontraram valor de 15,66%, na época seca na região Nordeste do Brasil, entretanto, Pignata et al., 2015, reportaram valor menor (12,02%). Os sólidos totais são parâmetros importantes para indústria de lácteos, pois sua proporção no leite indica rendimento industrial na fabricação de queijos (Araújo et al., 2011).

No presente estudo, a percentagem média de proteína no leite foi de $3,94\% \pm 0,43$, e 68% deste total correspondeu a caseína ($2,68\% \pm 0,02$). Das proteínas totais de leite de búfala, aproximadamente 80% são caseínas e 20% são traços de outras proteínas como beta-lactoglobulina, alfa-lactalbumina, imunoglobulina e lactoferrina (Livney, 2010). Os valores encontrados estão dentro de parâmetros reportados por outros autores (Rosati; Van Vleck, 2002; Amaral et al., 2005) (Tabela 1).

O potencial de produção do queijo muçarela depende em grande parte da composição do leite em gordura e proteína, sendo a proteína responsável pela firmeza e estiramento, características essenciais no processamento do queijo muçarela (Murtaza et al., 2008; Jana; Mandal, 2011), bem como a contagem de células somáticas (CCS), pasteurização, tipo de coagulante e parâmetros de fabricação, entre outros (Fenelon; Guinee, 1999). Com os valores obtidos para os parâmetros proteína e gordura foi possível produzir, em média, $21,79\text{kg} \pm 2,47$ de queijo muçarela para cada 100 litros de leite. Essa estimativa está de acordo com o preconizado pela indústria leiteira que calcula o rendimento do queijo baseando-se no volume de leite (5 L) utilizado para produzir um kg de queijo. Portanto, a fórmula de Del Prato, (1988) pode ser útil para avaliar o rendimento do queijo apenas com as informações do componente do leite.

O queijo muçarela obtido no presente estudo apresentou $4,63\% \pm 0,27$ de gordura, $14,47\% \pm 0,56$ de sólidos totais e $4,26\% \pm 0,18$ de proteína (Tabela 1). A composição do queijo muçarela depende do tipo de leite utilizado e do procedimento para a sua fabricação (Jana; Mandal, 2011; Putra et al., 2015), entre os meses julho e janeiro, encontrou valores de gordura no queijo que variaram de 3,79% a 10,13%. Além da

forma de processamento, o teor de gordura do queijo depende do teor de gordura no leite, mas no processo de fabricação do queijo existe a possibilidade da perda de gordura durante o processo de aquecimento a uma temperatura superior a 80 ° C (Fox et al., 2000). Apesar de não ter sido encontrado polimorfismo para os genes estudados, todas as búfalas avaliadas apresentaram genótipo BB para o gene na Kappa-caseína e AA para o gene da Beta-lactoglobulina.

CONCLUSÕES

Os búfalos da raça Murrah, nas regiões do Agreste e Mata Sul de Pernambuco, apresentaram apenas os genótipos BB e AA para os genes da kappa-caseína e Beta-lactoglobulina respectivamente. Sendo esses resultados relacionados, com alta qualidade do leite e rendimento do queijo muçarela de búfalas, observamos que não ocorreu diferenças significativas entre elas, confirmando assim, que os valores encontrados em nossas análises estão dentro dos parâmetros utilizados pela indústria. Contudo, a falta de variabilidade genética nos dois locos gênicos também pode ser resultante do processo de seleção durante décadas para obtenção de animais com bom potencial leiteiro. Diante do exposto, deve-se considerar que a população pode resultar de acasalamentos endogâmicos, o que resulta em aumento da homozigose e consequentemente no monomorfismo observados nos locos gênicos analisados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Empresários Rurais por ter liberado os seus rebanhos e ajuda dos seus funcionários para fazer a coleta de amostras biológicas. Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEANDRI R., BUTTAZZONI L.G., SCHNEIDER J.C., CAROLI A. & DAVOLI R. 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese producing ability. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.241-255.
- AMARAL F. R., CARVALHO L. B., SILVA, N. & BRITO J. R. F. 2005. Qualidade do leite de búfalas: composição. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 29(2):106-110.
- ANGIOLILLO A., YAHYAOU M.H., SÁNCHEZ A., PILLA F. & FOLCHET J. M. 2002. short communication: Characterization of a new genetic variant in the caprine κ -casein gene. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.85, p. 2679-2680.
- ARAÚJO T. P. M., RANGEL A. H. N., SOARES A. D., LIMA T. C. C., LIMA JÚNIOR D. M. & NOVAES L. P. 2011. Influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento. *Agropecuária Científica no Semi-Árido*, 7(1):1-5.
- BADOLA S. BHATTACHARYA T.K., BISWAS T.K., SHIVAKUMAR B.M., KUMAR P., MISTRA S.S. & SHARMA A. 2003. Polimorfismo do gene da beta-lactoglobulina de Bubaline: Um contraste de sua contrapartida bovina. *Buffalo J.* 19 (4), 291-298.
- BOVENHUIS H., JOAN A. M., VAN A. & KORVER, S. 1992. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J. Dairy Sci.*, 75:2549 - 2559.
- CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J. et al. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.2885-2889, 2002.
- COSTA FILHO M.H.B., JÚNIOR D.M.L, RANGEL A.H.N, SANTOS S., NOVAES F.J., JÚNIOR L.P., SANTOS SILVA J.G.B., MORENO M.J.M. & GREICY G.M.B. 2014. Zazonalidade e variação na qualidade do leite de búfalas no Rio Grande do Norte. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.8, n.3, p.201-208.
- CUNHA NETO O. C., OLIVEIRA C. A. F., HOTTA R. M. & SOBRAL P. J. A. 2005. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. *Ciência Tecnologia Alimentos*. 25(3):448-453.
- DEL PRATO, O.S. 1998. *Trattato di tecnologia casearia*. Edagricole. 1070 p.
- EL-SALAM M.H.A & EL-SHIBINY S. 2011. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Science and Technology*, v.91, p.663-699.
- FAO. Food and Agriculture Organization, (2013). *O búfalo*. Brasília: Ministério da Agricultura; Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos São Paulo.

FENELON M.A. & GUINEE T.P. 1999. The effect of milk fat on Cheddar cheese yield and its prediction, using modifications of the Van Slyke cheese yield formula. *J. Dairy Sci.* 82, 2287-2299.

FOX P.F., GUINEE T.P., COGAN T.M. & MCSWEENEY P.L.H. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers. Washington DC. 169-205.

FOX P.F. & MCSWEENEY P.L.H. 2003. *Advanced dairy chemistry: proteins*. 3. ed. New York: Kluwer Academic. v.1. 740p.

GALIERO G. & MORENA C. 2000. The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. *Bubalus bubalis*, n.4, p.26-27.

GRAVERT H. O., SCHULTE-COERNO H. & OLOFFS K. 1991. The relevance of k-casein for genetic differences in cheesemaking properties. Paper presented at Specialists mtg of the Int. Circle of Dairy Research Leaders on Genetic Polymorphism of Milk Proteins, April 11-12, 1991, Laboratory of Dairy Science, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, MILK. 1995. Enumeration of somatic cells. IDF Standard 148A, Brussels. p. 8.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. MILK. 1996. Standards 141 B. Whole milk – Determination of milk fat, protein and lactose content. Guide for the operation of mid-infrared instruments. Brussels: IDF.

JAAYID T.A. & DRAGH M.A. Genetic Biodiversity in Buffalo opulation of Iraq Using Microsatellites Marker, *J. Agr. Sci. Tech.* 3 (2013) 297-301.

JANA A.H. & MANDAL P.K. Manufacturing and quality of mozzarella cheese. 2011. *International J. of Dairy Sci.* 6:199-226.

KARIMI K., NASIRI M.T., FAYYAZI J., MIRZADEH K.H. & ROUSHANFEKR H. 2009. Alelo e genótipo freqüência de-lactoglobulina gene em Najdi iraniano bovinos e populações de búfalos utilizando PCR-RFLP. *African Journal of Biotechnology*, 8 (15).

LAWRENCE R.C., 1993. Cheese yield potential of milk. In: *Factors affecting the yield of cheese*. Ed. D.B. Emmons. Inter. Dairy Feder. Brussels, 109-120.

LIVNEY Y.D. 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* V.15: p.73–83.

MACHEBOEUF D., COULON J. B. & P. D’HOUR. 1993. Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cows’ milk coagulation properties. *J. Dairy Res.* 60:43-54.

MALHADO C.H.M., RAMOS A.A., CARNEIRO, P.L.S., AZEVEDO D. M. M. R., MARTINS FILHO R. & DE SOUZA J. C. 2008. Melhoramento e estrutura populacional

em bubalinos da raça Mediterrâneo no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.2, p.215-220.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), Secretaria de Defesa Agropecuária. 2003. Instrução Normativa No 62, 25, 08.

MITRA A., SCHLEE P., KRAUSE I., BLUSCH J., WERNER T., BALA C. R. & PIRCHNER F. 1998. Kappa casein polymorphism in the Indian dairy cattle and buffalo: A new genetic variant in buffalo. *Anim Biotechnol* 9, 81-87.
<http://dx.doi.org/10.1080/10495399809525896>.

MURTAZA M. A., REHMAN S. U., ANJUM F. M. & HAQ N. 2008. Nutritional comparison of cow and buffalo milk cheddar cheese. *Pak. J. Nutr.* 7: 509-512.

OLIVEIRA, R. L. 2004. Ácidos graxos de cadeia longa (CLA) no leite e seus benefícios para o consumo. In: Congresso Nacional de Zootecnia, 14. Brasília.

OTAVIANO A. R., TONHATI H., SENA J. A. D., LIMA A. L. F., BOTTGER G., HOLGADO P. R. A. & CARDONA H. C. 2005. Extração de DNA a partir de queijos mozzarella produzido com leite de búfalas com vistas às provas para a identificação de misturas com leite de vaca. *Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes*, v.60, p3-6.

PIGNATA M.C., FERRÃO S.B.F., OLIVEIRA C.P., FALEIRO A.S., BONOMO R.C., SILVA W.S., RODRIGUES L.B. & FERNANDES S.A.A. 2015. Mechanical Parameters of the Mozzarella from Buffalo with Inclusion Levels of The Cow's Milk: Preliminary Study at the Lab Scale. *J Bioanal Biomed.* V. 7: 191-196.

PIPALIA D., LADANI D., BRAHMKSHTRI B., RANK D., JOSHI C., VATALIYA P. & SOLANKI J. 2001. Kappa-casein genotyping of Indian Buffalo breeds using PCR-RFLP. *Buffalo J.*, 17, 195-202.

PUTRA S., PURWANTO B.P., DAMAYANTHI E. & HENI RIZQIATI Y. 2015. Characteristics of mozzarella cheese from water buffalo milk in north Sumatra, *Applied Research Journal.* Vol.1, Issue, 4, pp.216-221.

RACHAGANI S, GUPTA I.D., GUPTA N. & GUPTA S.C. 2006. Genotyping of beta-lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. *BMC Genet.* 7: 31-34.

RAHALI, V., & J. L. ME'NARD. 1991. Influence of genetic variants of b-lactoglobulin and k-casein on milk composition and cheesemaking properties. *Lait* 71:275-297.

ROBITAILLE G., BRITTEN M., MORISSET J. & PETITCLERC D. 2002. Quantitative analysis of β -lactoglobulin A and B genetic variants in milk of cows β -lactoglobulin AB through lactation, *J. Dairy Res.* 69, 651-654.

RONCADA P., GAVIRAGHI A., LIBERATORI S., CANAS B. & GREPPI, G.F. 2002.

Identification of caseins in goat milk. *Proteomics*, 2(6): 723-726.

ROSATI A. & VAN VLECK, L.D. 2002. Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and mozzarella cheese production in the Italian river buffalo population. *Livest. Prod. Sci.*, v.74, n.2, p.185-190.

SENO L.O., CARDOSO V.L. & TONHATI H. 2007. Valores econômicos para as características de produção de leite de búfalas no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Zootecnia*. vol.36 no.6 suppl.0 Viçosa Nov./Dec.

SILVA I.D. & SILVA K.F.S.T. 1994. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. *Buffalo J*, v.10, p.133-137.

SINGH S., PUSHPENDRA K. & BHATTACHARYA, T. K. 2005. DNA polymorphism of κ -CN and β -CN genes and its association with milk production and quality traits in buffalo (*B. bubalis*). *Proceeding of National Symposium on Domestic Animals Diversity: Status, Opportunities and Challenges*, Karnal, India.

STRAZALKOWSKA N., KVZEWSKI J. & RYNIEWICZ Z. 2002. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin polymorphism cows age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black and white cattle. *Anim. Sci. Papers Reports*, 20: 21-35.

TONHATI H., ALBUQUERQUE L. G., OLIVEIRA J. F. S. & BARUSELLI P.S. 1996. Melhoramento Genético em Bubalinos, Programa Vale do Ribeira, S.P. In: *Anais do 1º Simpósio do Nacional de Melhoramento Animal*. Ribeirão Preto, S. P.p.69-72.

TONHATI, H. Critérios de seleção para produção total de leite em bubalinos criados no Estado de São Paulo. 2002. 68 f. Tese (Livre Docência), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

VARRICHIO M. L., DI FRANCIA A., MASUCCI F., ROMANO R. & PROTO V. Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat. *Italian J. Animal Sci.* 6:509-511. 2007.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. da. Características do leite. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo/Pró-Reitoria de Extensão, Programa Institucional de Extensão, 2007. (Boletim Técnico - PIE-UFES: 01007).

VERRUMA MR, SALGADO JM. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. *Sci Agric*, v.51, p.131-137, 1994.

WALSTRA P., WOUTERS J.T.M. & GEURTS T.J. 2006. *Dairy science and technology*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 782p.

YAHYAOU M. H. ANGIOLILLO A., PILLA F., SANCHEZ A. & FOLCH J. 2003. Characterization and genotyping of the caprine kappa-casein variants. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 86, p. 2715-2720, 2003.

FIGURAS

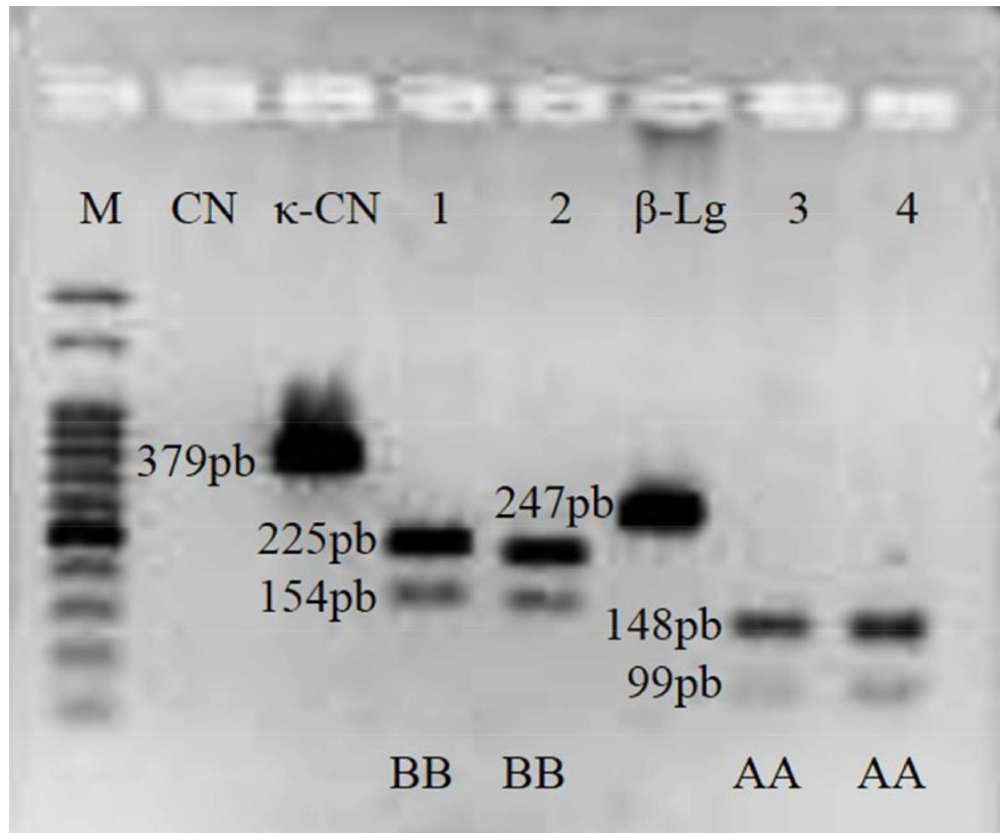


Figura 1. Eletroforese de produtos de PCR e PCR-RFLP do gene da κ -Cn (379pb) e β -Lg (247pb). M - Marcador de 50pb; CN - controle negativo; κ -Cn – Produto de amplificação da κ -Cn; 1 e 2 - Produtos de digestão da κ -Cn, padrão de bandas de 225pb e 154pb; β -Lg – Produto de amplificação da β -Lg; 3 e 4 - Produtos de digestão da β -Lg, padrão de bandas de 148pb e 99pb. κ -Cn - Kappa-Caseína, β -Lg- Beta-Lactoglobulina

Tabela 1. Composição do leite e do queijo muçarela de búfalas com genótipos BB e AA para os genes da κ -Cn e β -Lg, respectivamente.

Parâmetros	Leite	Queijo
Proteínas (%)	$3,94 \pm 0.43$	$4,26 \pm 0.18$
Caseína (%)	$2,68 \pm 0.02$	-
Gordura (%)	$6,47 \pm 1.53$	$4,63 \pm 0.27$
Sólidos totais (%)	$16,23 \pm 1.59$	$14,47 \pm 0.56$

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A combinação desses dois genótipos contribuiu para que os animais apresentassem as características desejáveis para produção de leite e queijo com qualidade e bom rendimento. Assim sendo, esse SNP (single nucleotide polymorphism) pode ser utilizado como marcador molecular para identificação individual e de pureza racial e para avaliação de produtos de origem. E por fim os genótipos identificados podem ser utilizados para melhoramento genético de rebanhos bubalinos leiteiros.

7. ANEXOS



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



CEUA - UFRPE
Aprovado em
06/02/2017
Validade
05/02/2019

Comissão de ética no uso de animais – CEUA- C-02

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	02/ 2017
Número do processo	23082/006150/2015-54
Data de emissão da licença	06 de fevereiro de 2017
Título do Projeto	Avaliação do efeito do polimorfismo do genes da Kappa-caseína e beta-lactoglobulina na composição do leite e rendimento do queijo de búfala no estado de Pernambuco
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Manoel Adrião Gomes Filho
Colaboradores	Izabella de Albuquerque Ramalho, Aurea Wischral, Severino Benoné Paes Barbosa; Jamilly Lopes de Macedo; Diego de Souza Dantas; Ericka Fernanda Ferreira de Queiroz; Ellen Cordeiro Bento da Silva; Carla Lopes Mendonça
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Bubalinos: Linhagem Murrah, idade: 4anos. 10 Machos e 290 Fêmeas. Total: 300



Prof.ª Dr.ª Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA

Marleyne Amorim
Prof.ª. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)