

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

BÚFALAS PRODUZEM NATURALMENTE LEITE A2

LOUISE SARMENTO MARTINS DE OLIVEIRA

**SALVADOR - BAHIA**

**MARÇO 2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

BÚFALAS PRODUZEM NATURALMENTE LEITE A2

LOUISE SARMENTO MARTINS DE OLIVEIRA

Bacharel em engenharia química

**SALVADOR - BAHIA**

**MARÇO 2020**

LOUISE SARMENTO MARTINS DE OLIVEIRA

BÚFALAS PRODUZEM NATURALMENTE LEITE A2

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração:  
Melhoramento animal

Orientador: Prof. Dr. Gregório Miguel Ferreira de Camargo.

Coorientador: Prof. Dr. Raphael Bermal Costa.

**SALVADOR – BA**

**MARÇO 2020**

**LOUISE SARMENTO MARTINS DE OLIVEIRA**

**BÚFALAS PRODUZEM NATURALMENTE LEITE A2**

Tese defendida e aprovada pela Comissão Examinadora em 02 de Março de 2020.

---

Dr. Gregório Miguel Ferreira de Camargo

UFBA

Presidente

---

Dr. Luis Fernando Batista Pinto

UFBA

---

Dr. Humberto Tonhati

UNESP

**SALVADOR – BA**

**MARÇO 2020**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo amor e apoio incondicional ao longo de toda a caminhada da minha vida.

Aos meus irmãos, a minha avó e aos meus tios pelo apoio e pela companhia.

A Davi pelos 12 anos juntos compartilhando momentos.

Às minhas cachorrinhas pelo amor e pela companhia.

Agradeço aos meus amigos pela companhia e por fazerem parte da minha vida.

Aos meus professores Gregório e Raphael pela orientação e ensinamentos.

Às minhas amigas Jackeline, Marisa e Jaqueline, adquiridas ao longo do mestrado por me ajudarem na pesquisa e pela companhia.

A todos os estagiários do laboratório que me ajudaram com a realização deste estudo.

Ao Prof. Luis Pita por disponibilizar seu laboratório para realização de análises e a Waléria por me ajudar nestas análises.

Aos produtores Mariel Fujissawa, Renato Amaral, Antônio Peixoto, Urbano Souza Filho e Jonas Assumpção pela disponibilidade de coleta de material biológico.

À EMBRAPA pela disponibilização de parte das amostras de DNA utilizadas.

Ao proprietário Francisco Veloso pela concessão de genótipos dos animais do seu rebanho.

À CAPES pelo financiamento da pesquisa.

À FAPESB pela concessão de minha bolsa.

**LISTA DE FIGURAS****Capítulo 1**

	<b>Página</b>
Figura 1. Produção mundial de búfalos 2016/2017.....	3
Figura 2. <i>Bubalus arnee</i> .....	5
Figura 3. Búfalos das raças (A) Murrah, (B) Carabao, (C) Jafarabadi e (D) Mediterrâneo .....	9

## SUMÁRIO

### Capítulo 1

#### Página

Búfalas produzem naturalmente leite A2

REVISÃO DE LITERATURA .....	2
1. Introdução .....	2
2. Panorama mundial e brasileiro da produção bubalina .....	3
3. Importância socioeconômica na Ásia e no Brasil .....	4
4. Origens dos búfalos .....	5
5. Características dos búfalos .....	6
6. O búfalo no Brasil .....	8
7. Melhoramento genético e genética molecular .....	9
7.1. Parâmetros genéticos .....	10
7.2. Genética molecular .....	11
8. O leite de búfala .....	13
8.1. Proteínas .....	14
8.2. Proteínas do soro .....	14
8.3. Caseínas .....	15
9. A beta-caseína .....	15
10. Impactos à saúde .....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	18

### Capítulo 2

SHORT COMMUNICATION: Búfalas produzem naturalmente leite A2. ....	2
ABSTRACT .....	2
Short communication .....	2
ACKNOWLEDGMENTS .....	5
REFERENCES .....	5

## **CAPÍTULO 1**



## Búfalas produzem naturalmente leite A2

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1. Introdução

O ser humano é o único mamífero a prolongar a ingestão de leite ao longo de toda a vida. O consumo desse alimento nos acompanha desde antes da existência das civilizações, remete ao período de transição entre o homem caçador e nômade para o homem sedentário e fixo, o período da revolução neolítica (BEJA-PEREIRA et al., 2006). Tornou-se possível controlar os suprimentos de alimentos de uma forma inovadora e única no reino animal.

O lobo (*Canis lupus*) é considerado o primeiro animal a ser domesticado. Estima-se que este evento teve início há pelo menos 15.000 anos e resultou nos principais companheiros dos seres humanos, os cachorros. Já os outros animais ancestrais foram sendo domesticados pouco a pouco, com registros datados de 10.000 anos, com a finalidade de servir ao homem como alimento e força de trabalho. O mouflon oriental (*Ovis orientales*) deu origem as ovelhas, do auroque (*Bos primigenius*), já extinto, surgiu o boi, do Arni (*Bubalus arnee*), derivou-se o búfalo, entre outros (VIGNE, 2011).

Não apenas o ser humano modificou a natureza ao seu redor, como também foi modificado. À medida em que o pastoreio se tornou parte da humanidade, o consumo de leite selecionou pessoas lactase persistentes, transformando o homem no único mamífero a prolongar a ingestão até a idade adulta a partir de um processo chamado de co-evolução gene-cultura.

Atualmente, cerca de 35% da população produz lactase durante a vida adulta (LEONARDI et al, 2012), e são capazes de ingerir grandes quantidades de lactose. Os 65% intolerantes a lactose conseguem se beneficiar do consumo do leite através de seus derivados.

Diante da história pretérita, é possível esperar que o leite possua papel relevante na sociedade contemporânea. De acordo com a FAO, em 2016, 30% da ingestão calórica da população mundial é derivada de produtos de origem animal. Destacando apenas os laticínios, a ingestão calórica chega a 15%. A produção global neste mesmo ano foi de 798 milhões de toneladas.

## 2. Panorama mundial e brasileiro da produção bubalina

Dentre as variedades existentes, o leite de origem bovina é o que ocupa a maior fatia do mercado, com 83% da produção mundial. O leite bubalino vem logo em seguida, compreendendo 14% da produção mundial. Em números absolutos equivale a mais de 600 e 115 milhões de toneladas respectivamente (FAO, 2017).

A população mundial de búfalos, em 2017, ultrapassou 200 milhões de cabeças, das quais 195 milhões de cabeças estão concentradas na Ásia (FAO, 2017). A Índia é o país com o maior contingente desses animais, cerca de 50% da população (aprox. 113mil cabeças). Cabe destacar também outros países asiáticos como China, Paquistão, Nepal, Filipinas. Ao redor do mar Mediterrâneo também existe uma outra aglomeração desses animais nos países: Itália, Egito, Turquia e Irã.

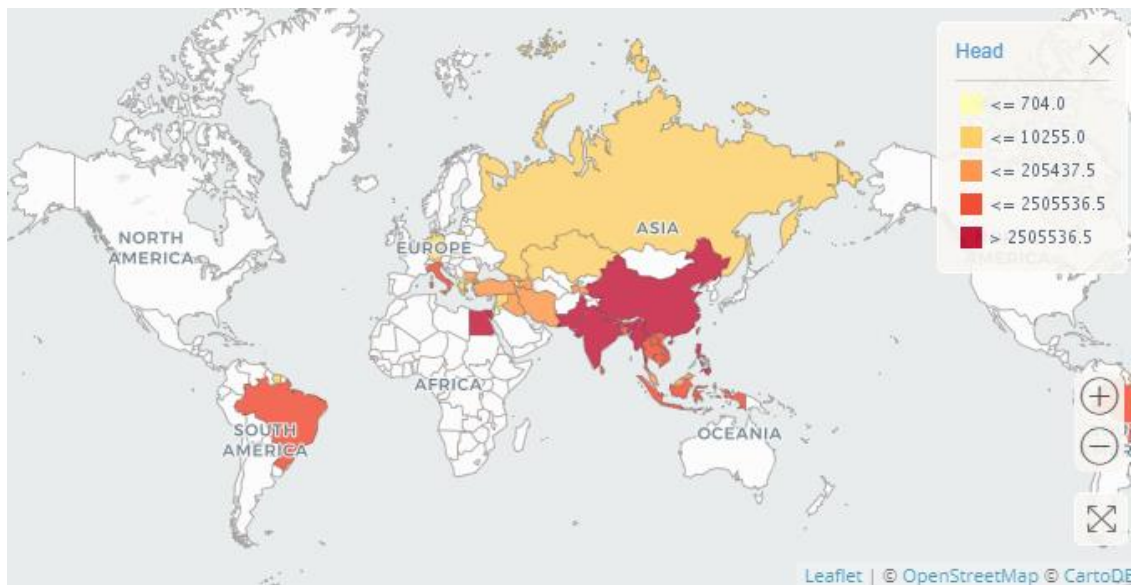


Figura 1 - Produção mundial de búfalos 2016/2017

Nas Américas, o Brasil ocupa posição de destaque na produção bubalina, sendo o país líder na criação desses animais, com pouco mais de 1 milhão e 200 mil cabeças (FAO, 2017). A distribuição do rebanho no país é irregular, com grande concentração na região norte e no estado de São Paulo. O estado do Pará é o que possui maior contingente, com 320 mil animais aproximadamente, seguido do Amapá. Amazonas e São Paulo seguem com uma população muito semelhante, em torno de 68 mil cabeças. Dentre os 10 maiores produtores, a Bahia está em 9º, com 16 mil animais (IBGE, 2017).

Sobre a indústria de derivados mundial, em 2014 foram produzidas 282 mil toneladas de queijo, 890 mil toneladas de manteiga e mais de 3 milhões de toneladas de ghee (FAO, 2017).

De acordo com o censo agropecuário de 2006 realizado pelo IBGE, em todo o país foram 82 mil búfalas ordenhadas que resultaram em uma produção de 92,3 milhões de litros de leite anuais, sendo que 45 milhões de litros são transformados em 18,5 mil toneladas de derivados o que fomentou a circulação que ultrapassa 50 milhões de dólares (BERNARDES, 2007).

### **3. Importância socioeconômica na Ásia e no Brasil**

A existência desses animais é fundamental para o desenvolvimento socioeconômico do continente asiático. A maioria dos países são basicamente agrários, em alguns deles a pecuária pode chegar a representar até 25% do produto interno bruto. Os búfalos são animais robustos e fortes, capazes de se desenvolver em situação de baixa qualidade de forragens por conta disso são frequentemente utilizados como força de trabalho em pequenas propriedades, especialmente para o cultivo do arroz, que requer longas horas em regiões alagadiças.

Não só o trabalho é extraído como diversos subprodutos como alimento, couro e esterco (NANDA e NAKAO, 2003). São responsáveis por trazer segurança alimentar e reduzir os limites da pobreza em vários países (RANJHAN, 2007).

No Brasil, os búfalos vêm sendo criados usualmente por pequenas e médias propriedades, originalmente para produção de carne, porém, o mercado leiteiro vem se desenvolvendo, especialmente a partir dos anos 90 (BERNARDES, 2007). A Embrapa possui um projeto que implanta sistemas integrados de produção de búfalos focado nos pequenos produtores, para elevar a produtividade e gerar riqueza para a comunidade rural, de forma a minimizar os impactos ambientais.

A ilha de Marajó, por exemplo, é uma localidade que se beneficia economicamente da criação bubalina, ao mesmo tempo em que promove distribuição de riqueza para a população. Estima-se que 80% dos produtores da ilha sejam pequenos proprietários de terras com até 200 cabeças. O desenvolvimento da pecuária local gera desenvolvimento em outros setores como a produção de derivados, de couro, de

artesanato e de calçados. Os animais, pela natureza dócil, fazem parte da comunidade, circulando livremente e interagindo com a população (SEDANO, 2019).

#### 4. Origens dos búfalos

O búfalo é considerado um animal semiaquático e com tendência a chafurdar. Esse hábito o protege do estresse térmico e da infestação de ectoparasitos. Por possuir um temperamento bastante dócil e uma fisiologia adaptada a climas quentes, se tornou amplamente utilizado pelo homem para fornecimento de leite, carne e trabalho, até os dias atuais (COCKRILL, 1981).

É um animal de fundamental importância para o desenvolvimento socioeconômico do continente asiático, de onde remete as origens. O búfalo é um mamífero da família Bovidae, subfamília Bovinae. Dentro dessa subfamília existem nove divisões, incluindo o gênero *Bubalus*. A espécie *B. arnee* foi a domesticada e recebeu o nome de *B. bubalis* (NAGARAJAN et al., 2015; COLLI 2018; PRESICCE, 2017). O búfalo doméstico criado mundialmente (búfalo d'água) é denominado de *Bubalus bubalis*.

O búfalo doméstico é dividido em duas subespécies: o *Bubalus bubalis bubalis*, com  $2n=50$  cromossomos e também são chamados de “búfalos do rio” e o búfalo do pântano (*Bubalus bubalis kerabau*) com  $2n=48$  cromossomos. A diminuição dos pares de cromossomos se dá por uma fusão cêntrica. Pode ocorrer acasalamento entre as duas subespécies, porém a fertilidade será reduzida com o passar das gerações (BAKER, 2014).



Figura 2 *Bubalus arnee*

Acredita-se que o *B. arnee* tenha sido originário do sudoeste asiático e que tenha se espalhado pela Índia, onde evoluiu para o do tipo rio. Em paralelo a esta migração também ocorreu a fusão dos cromossomos 4 e 9 em alguns animais (ZHANG et al, 2020)

dando origem a outra subespécie. Diversos eventos naturais contribuíram para a domesticação independente dos tipos de búfalos, o búfalo do rio na Índia e o búfalo do pântano na China (LEI et al., 2007). Estudos revelam evidências de que houve expansão dos búfalos pela Ásia e Europa em eventos migratórios de maneira lenta e descontinuada (ZHANG et al, 2020).

## 5. Características dos búfalos

Os bubalinos apesar de não serem do gênero *Bos*, abrigam particularidades em relação aos seus parentes bovinos. Primeiramente, como já citado nesse trabalho a docilidade desse animal é própria da espécie, facilitando o manejo e o convívio com estes animais. Diferenças de composição e qualidade da carne e do leite são notáveis, que serão melhor pormenorizadas.

Comparativamente com bovinos, a produção bubalina ainda está bastante aquém. Em sistemas pouco intensificados a produção por lactação se encontra numa média de 1.460kg. Já em sistemas mais intensificados e com animais de maior valor genético a produtividade pode alcançar 3.000kg/lactação. A variabilidade produtiva é expressiva, com animais que podem variar a produção entre 900kg até 5.142kg por lactação. Em um estudo realizado no Paquistão, a produção comercial média atingiu a marca de 3450 litros/lactação (TASHA, 2007). De posse desses dados, é possível observar o potencial produtivo através da implantação ou da melhoria de processos de seleção, melhoramento genético e de manejo (BERNARDES, 2007).

A vida produtiva de uma búfala é longa, podendo se estender até 24 anos. Possuem alta taxa de fertilidade, mais de 90% a vida útil média é de 15 anos, sem queda representativa de desempenho. Apesar de animais férteis, possuem uma sazonalidade reprodutiva, possuem fotoperíodo negativo, ou seja, há um aumento na fertilidade nos períodos de menor intensidade luminosa (outono/inverno), ainda que exista oferta de alimentos ao longo de todo o ano (BERNARDES, 2013).

Como consequência da estacionalidade, a produção leiteira também sofre oscilações. Para manter a oferta de produtos bubalinos constante, podem ser utilizadas técnicas de desestacionalização reprodutiva, no entanto, podem ocorrer perdas na fertilidade do rebanho (BASTIANETTO et al, 2005).

A temperatura ambiente pode ser um fator determinante na produção leiteira pois os mecanismos de termorregulação dos bubalinos são menos eficientes em relação aos bovinos. São animais que possuem baixa troca de calor com o ambiente através de suor devido a menor quantidade de glândulas sudoríparas. Por conta disso preferem pastar nas horas mais frias do dia e resfriar o corpo sob a água (PARK et al, 2017).

No entanto, observou-se de que estes animais possuem boa eficiência na troca térmica em zonas sombreadas o que pode dispensar a presença de lagos artificiais, lamaçais ou açudes nas propriedades. O estresse térmico provoca queda de produção leiteira, na taxa de concepção, na fertilidade e na libido dos machos (PARK et al, 2017).

Os búfalos também possuem maior eficiência da digestão comparativamente aos bovinos. Além da ingestão de alimento ser menor, em condições de baixa qualidade de forragens a digestibilidade de fibra bruta e extrato etéreo é maior. O mesmo padrão segue em búfalas em lactação, em comparação a bovinos, a ingestão de proteína e energia foi menor, para uma produção de 1kg de leite com 4% de gordura (PARK et al, 2017).

A qualidade dos produtos oriundos de búfalos insere esses animais em um cenário de alimentação mais nutritiva e saudável, cada vez mais presente nas demandas consumidoras. A carne bubalina possui menor quantidade de gordura, melhor cor, maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e um perfil desejado de ácidos graxos saturados (OLIVEIRA, 2005). A qualidade do leite, em comparação com o bovino será explanada em um tópico a parte.

De modo geral, os búfalos são animais considerados saudáveis, susceptíveis a diversas doenças, muitas delas em comum ao gado, porém, os efeitos dessas doenças podem ser menos evidentes (FAO, 2005). Algumas doenças apresentam quadro mais grave, como a hemorragia septicêmica (OIE, 2013a) e febre catarral maligna (OIE, 2013b).

Visto que os búfalos domésticos tiveram suas origens diferentes, é de se pensar que eles também possuam características particulares. O búfalo-do-rio é criado majoritariamente voltado à produção leiteira, também possuindo ótima aptidão para produção de carne, sendo bastante utilizado com duplo, até triplo propósito.

Comparados aos seus semelhantes Carabao, os búfalos-do-rio possuem maior mortalidade de bezerros, maturidade sexual tardia, sazonalidade na reprodução e menores taxas de concepção. Já os búfalos-do-pântano por serem considerados mais rústicos são

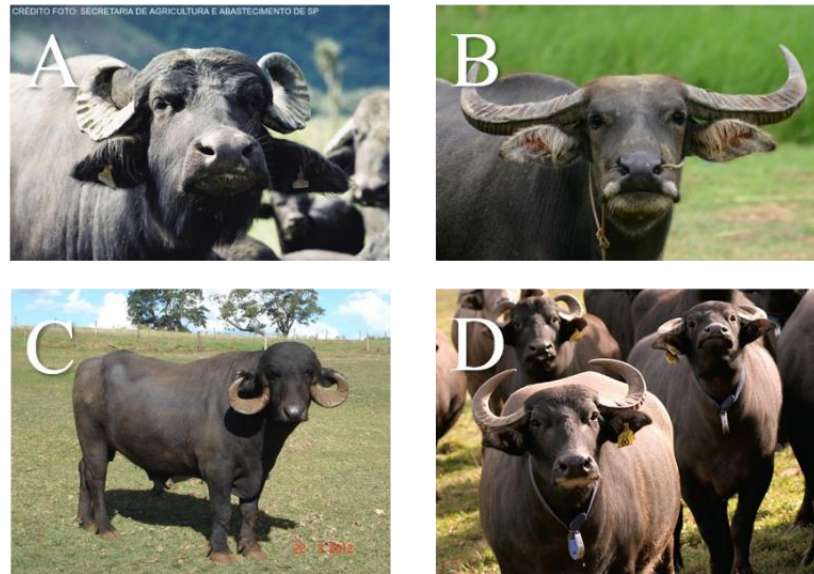
bastante utilizados para tração e, possuem características produtivas menos relevantes. Para melhorar tais características, alguns cruzamentos com búfalos-do-rio têm sido realizados (PRESICCE, 2017).

Nas Filipinas são realizados cruzamentos de fêmeas Carabao com machos de raças leiteiras. Como resultado, a produção nativa de leite mais que dobrou, da média de 1,5L/dia para 6L/dia por animal (IRANG, 2018). Na China, também são utilizados os cruzamentos dos animais nativos com as raças Murrah e Nili-Ravi para aumentar a produtividade (WANG et al., 2019).

## **6. O búfalo no Brasil**

Atualmente, no país, são reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) quatro raças de búfalos: Murrah, Mediterrâneo, Jafarabadi e Carabao sendo as três primeiras são búfalos do rio e a última, búfalo do pântano.

A principal forma de se distinguir as raças é com a observação do formato dos chifres e do perfil craniano. Os Murrah possuem chifres menores encaracolados em formato de meia lua e possuem um perfil craniano retilíneo. Os Mediterrâneos possuem chifres com formato de meia lua e perfil craniano convexo. Os Jafarabadi possuem chifres grandes, pesados e possuem perfil craniano ultra convexo e por fim os Carabao, que possuem chifres largos e aberto e perfil craniano retilíneo (ABCB, 2020).



*Figura 3 - Raças de búfalos (A) Murrah, (B) Carabao, (C) Jafarabadi e (D) Mediterrâneo*

A história dos búfalos no Brasil remete ao ano de 1890, em que se tem o primeiro registro de importação destes animais, da raça Carabao e levados para a ilha de Marajó. Desde então diversas introduções destes animais têm sido feitas. Atualmente a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos nos anos 2000 criou o chamado selo de pureza, uma certificação designada aos produtores que se comprometem a fabricar derivados apenas de leite bubalino, sem a adição do leite bovino, permitida em legislação (ABCB, 2020).

O instituto Totum desde 2013 gerencia, coordena e fiscaliza as atividades relacionadas ao programa de pureza. Este instituto avalia anualmente marcas de produtos derivados do leite bubalino. Das 17 marcas avaliadas, 8 conseguiram a concessão do selo de pureza. Esta certificação traz fortalecimento do mercado bubalino, através de campanhas publicitárias relacionadas ao tema (EMBRAPA, 2018)

## **7. Melhoramento genético e genética molecular**

Apesar de os bubalinos serem animais de interesse atual, pouco se sabe sobre acerca do genoma desse animal e o melhoramento genético desses também está aquém em relação ao de bovinos. Pode-se observar essa defasagem a partir da quantidade de sequenciamentos de nucleotídeos disponíveis, em torno de 66 mil ao passo que para bovinos o número ultrapassa 2 milhões (MICHELIZZI et al., 2010)



## 7.1. Parâmetros genéticos

A produção leiteira é o destaque da bubalinocultura e se faz necessário evoluir o melhoramento genético da espécie, ainda incipiente, visto que há significativa variabilidade produtiva leiteira com valores que oscilam entre 900 kg a 5.142 kg por lactação (BERNARDES, 2007).

As primeiras características a serem consideradas para um programa de seleção são aquelas relacionadas com a quantidade e qualidade do leite sendo elas: Produção de leite na lactação (PL), porcentagem de proteína (%P), porcentagem de gordura (%G), produção de gordura (PG) e produção de proteína (PP) (PEREIRA, 2012).

Os valores de herdabilidade foram calculados para cada uma dessas características, assim como as correlações genéticas. Para a produção de leite (PL) as herdabilidades obtidas oscilam entre 0,15 a 0,24. Para %P os valores são de 0,26 a 0,39. %G entre 0,21 a 0,38. Os valores para PG são 0,13 a 0,23 e PP 0,16 a 0,24 (ASPILCUETA-BORQUIS, *et al.*, 2010a; ASPICULETA-BORQUIS, *et al.* 2010b; ASPICULETA-BORQUIS, *et al.* 2010c; MALHADO, *et al.* 2007; MALHADO, *et al.* 2009; TONHATI, *et al.* 2000; TONHATI, *et al.* 2008; RAMOS, *et al.* 2006). Valores baixos a moderados como os apresentados são indicativos de que pode haver ganho genético mediante seleção.

As correlações genéticas entre as produções de leite e derivados são altas e positivas. Seleção focada na produção leiteira resultará em maiores quantidades de gordura e proteína ao final da lactação (0,877 para PL e PG; 0,962 para PL e PP). No entanto, as correlações genéticas entre a produção de leite e as porcentagens são negativas (-0,088 para %G e -0,143 para %P), a seleção focada exclusivamente na produção podem ter reflexos negativos na concentração de sólidos. A tendência genética para a produção bubalina relatada foi positiva, porém aquém do desejado (PEREIRA, 2012).

A contagem de células somáticas (CCS) também é uma característica a ser considerada em programas de melhoramento. Possui direta relação com a qualidade do leite, visto que é um indicativo de saúde do úbere. A mastite é uma inflamação do úbere decorrente de diversos patógenos e pode ser caracterizada pelo aumento da contagem de células somáticas. É responsável pela queda na qualidade e na produção bovina.

A herdabilidade é uma medida populacional e mutável. No estudo realizado com 1.985 fêmeas e 4.907 lactações estimou-se o valor de 0,26 para a herdabilidade da CCS

(ASPILCUETA-BORQUIS, NETO, *et al.*, 2010). Os mesmos autores calcularam correlações genéticas entre CCS e PL, PP e PG (-0,062, -0,02 e -0,104) baixas e negativas, assim como as correlações entre CCS e %P e %G (-0,126 e -0,055), sugestivo de que o aumento da produção mediante seleção não afetaria a CCS.

## 7.2. Genética molecular

Estudos no ramo da genética molecular auxiliam na seleção clássica de animais aptos para a produção, diminuindo o intervalo de gerações e, conseqüentemente, aumentando o ganho genético, além de elevar a compreensão dos benefícios e malefícios à saúde humana. Para um rebanho leiteiro é relevante estudar as características relacionadas primeiramente à produção de leite, porém não somente essas, características relacionadas à sanidade e bem estar animal.

Polimorfismos nos genes responsáveis pela produção dos componentes do leite vem sendo estudados e caracterizados. Existem atualmente diversos estudos que focam em identificar essas mutações e suas conseqüências na estrutura, composição das proteínas e a relação com a produção leiteira.

Polimorfismos na kappa e na alfa caseína estão diretamente ligados eficiência na produção de queijo. As variantes genéticas  $\kappa$ -CNXI e  $\alpha$ -S1CNB proporcionam melhor rendimento queijeiro, pois relacionam-se ao maior teor de proteínas (ZICARELLI *et al.*, 2020).

Dayem *et al* (2009) em estudo com 40 búfalos machos observaram monomorfismo nesse grupo para o alelo B da Kappa caseína, alelo este relacionado a maior produtividade leiteira em raças bovinas determinadas (STIPP *et al*, 2013). Outro estudo foi realizado acerca da  $\alpha$ -S1CN e os alelos B e C a foram relacionados a características de produção. O genótipo BC, a maior produção de leite e o genótipo CC, a maior teor de gordura e proteína em bovinos (HRISTOV *et al*, 2018).

Além das caseínas, os genes das proteínas do soro também influenciam a produção leiteira em bovinos. O gene da  $\beta$ -lactoglobulina possui correlação significativa com produção de proteína (MANCINI, *et al.*, 2013) e o gene da  $\beta$ -lactoalbumina possui alelos relacionados ao aumento da produção de sólidos totais (RAMESHA, 2008). A grande

parcela dos estudos está relacionada aos bovinos e é necessário desenvolver a pesquisa com bubalinos a fim de se aumentar o conhecimento sobre a espécie.

Liu et al. (2017) realizaram um estudo de associação ampla para identificação de QTL que interferem características de produção em bubalino. Quatro SNPs em duas regiões genômicas foram encontrados e possuem associação com produção de leite e produção e porcentagem de gordura e proteína. Coincidentemente estas mesmas regiões foram encontradas em bovinos.

Gu et al. (2019) estudaram polimorfismos no gene da esteaóril-CoA dessaturase (SCD). Um único polimorfismo está associado à qualidade e produção de leite, características favorecidas pelo alelo C. (DU et al., 2019) publicaram uma revisão que apontam 19 genes candidatos contendo 47 mutações relacionados a produção de leite em búfalos do rio.

Estudos acerca do gene *DGATI* (diacylglicerol aciltransferase) apontam que esse gene também está relacionado a produção leiteira bubalina. Dois polimorfismos localizados nos éxon 13 e 17 foram encontrados. A mutação do éxon 13 não foi encontrada em búfalos do pantano. Essa mutação está significativamente relacionada com pico de produção de leite, produção total e porcentagem de proteína. A mutação do éxon 17 está relacionada a porcentagem de gordura (LI et al., 2018).

Stella et al (2018) sugerem que dois genes (*CSF3* e *LPO*) podem ser utilizados como genes candidatos em programas de melhoramento para a seleção de animais saudáveis pois, em animais que contraíram mastite a expressão desses genes foi maior comparado a animais saudáveis.

Mutações do tipo SNPs também foram encontradas em genes tradutores de proteínas do sistema complemento, um conjunto de proteínas importantes na formação da imunidade inata e adquirida. Na estrutura do gene codificante da proteína C5 do sistema complemento foram identificados nove SNPs inéditos, destes cinco estão relacionados a CCS nos búfalos, o que aponta uma possível contribuição desta proteína para a resistência à mastite (EL-HALAWANY et al., 2018).

A constante busca pelo conhecimento através da pesquisa aprofunda o que já se sabe atualmente acerca desses animais e serve de subsídio para futuras descobertas. Esses estudos também trazem para a realidade da bubalinocultura a possibilidade de maior eficiência na produção, com maiores ganhos para a economia em geral.

## 8. O leite de búfala

O leite bovino possui uma composição nutricional diversificada, capaz de fornecer diversos grupos nutricionais para uma dieta balanceada. Sua composição pode ser aproximada para uma média de 87% de água, de 3 a 4% de gorduras, 3% de proteínas, 4 a 5 % de lactose, 0,1% de vitaminas e 0,8% de sais minerais. Por abrigar aminoácidos essenciais, é considerado um alimento de alto valor biológico. Também é uma fonte de cálcio, zinco e vitaminas A,C e D (WATSON et al, 2017).

Já o leite bubalino possui maior quantidade de sólidos quando comparado ao anterior, por conta disso proporciona melhor rendimento na fabricação de manteigas e queijos. Pode ter até 3 vezes mais gordura e 40% mais calorias que o leite bovino. Composição média do leite bubalino: 82% água, 4 a 5% lactose, 4 a 5% proteínas, 8% gorduras, 0,8% minerais. Esse leite possui um sabor levemente adocicado, é mais viscoso e branco do que o bovino (PRESICCE, 2017).

Apesar de apresentar maior quantidade de gordura, o leite de búfala apresenta menor proporção de colesterol (PARK et al, 2017), maior proporção de CLA (ácido linoleico conjugado) (VARRICCHIO et al, 2007), também em comparação ao bovino. Estudos apontam que o CLA pode trazer benefícios à saúde realizando funções anti-carcinogênica, antidiabética e anti-hipertensiva (KOBAYASHI e YANAGITA, 2014) no entanto, outros autores não acreditam no potencial de alimento funcional, pois não possuem evidências conclusivas (BENJAMIN et al, 2015).

Como mencionado, o leite de búfala possui uma cor clara esbranquiçada e é devida ao fato de possuir menor quantidade do corante amarelo caroteno, corante este que é convertido em vitamina A pelo animal (WAHID e ROSNINA, 2016). Em relação aos bovinos, os bubalinos possuem mais vitamina A, no entanto, proporcionalmente a quantidade de gordura a concentração da vitamina se torna menor (PARK et al, 2017).

A lactose é o carboidrato presente no leite dos mamíferos, possui diversas funções no organismo tais como o fornecimento de energia, crescimento da flora intestinal e defesa contra infecções bacterianas e virais. O leite de búfala contém maior concentração desse oligossacarídeo que poderia trazer maiores complicações aos indivíduos intolerantes à lactose, todavia não há relatos de tantos casos comparados com aqueles

após a ingestão do leite bovino. É possível de que este evento seja devido repartição da lactose diferente em relação ao leite de vaca (AHMAD et al, 2013).

### **8.1. Proteínas**

Nas proteínas reside o objeto de estudo dessa revisão logo, cabe destacar um tópico apenas para esse assunto. As proteínas do leite podem ser divididas em dois grandes grupos: as solúveis e as não solúveis. As solúveis são as chamadas proteínas do soro do leite (*Whey protein*) e as insolúveis, de caseínas. 20% da composição total proteica corresponde às whey protein enquanto que os 80% restantes são caseínas (WATSON et al, 2017).

As proteínas do leite possuem funções muito além da nutrição. Após a digestão elas dão origem a uma gama de peptídeos bioativos que podem desempenhar diversas funções no organismo tais como a imunomoduladora e o combate a infecções. Esses peptídeos também podem melhorar a absorção de outros nutrientes (MILLS et al, 2011).

### **8.2. Proteínas do soro**

As proteínas solúveis que se enquadram nessa categoria são as lactoglobulinas, imunoglobulinas, albumina, lactoferrinas, lactoperoxidases, lisozimas entre outras. Cada uma delas é capaz de desenvolver funções no organismo e são potenciais fatores de melhoria na saúde dos consumidores do leite.

Há estudos que apontam a função antimicrobiana da lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima (HANCOCK, 2009; MIN et al., 2006; SISECIOGLU et al., 2010). Também existem estudos que sugerem sinergia da beta-lactoglobulina com anticarcinogênicos. A alfa-lactoglobulina também é uma potencial anticarcinogênica (PARODI, 2007).

### 8.3. Caseínas

As caseínas têm sido reconhecidas principalmente como transportadores e ligantes minerais, principalmente para cálcio e fósforo sob a forma de micelas. Graças a estrutura de coágulo, a digestibilidade no estômago de neonatos é melhorada (HOLT et al, 2013).

Em bovinos, essas proteínas podem ser divididas em 04 tipos:  $\alpha$ S1 (30-46% das caseínas),  $\alpha$ S2 (8-11%),  $\beta$  (25-35%) e  $\kappa$ -caseínas (8-15%). Essas são geneticamente determinadas por 4 genes estruturais, localizados no cromossomo 6 e chamados de *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2*, e *CSN3* respectivamente, intimamente ligados em um cluster de 250-kb (CAROLI et al, 2009).

Cada um dos genes da caseína possui suas variantes alélicas, sendo que a alfa-caseína S1 possui 8 variantes (A, B, C, D, E, F, G, H), a alfa-caseína S2 possui 4  $\alpha$ S2-CN (A, B, C, D), a beta-caseína possui 13 (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I e G) (FIROUZAMANDI et al, 2018) e a kappa-caseína possui 11 (A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J) (CAROLI et al, 2009).

A digestão dessas proteínas pelo organismo dá origem a uma série de peptídeos bioativos com potenciais benefícios e malefícios para o organismo. Como benefícios podem ser citados ações citomodulatórias, imunomodulatórias, anti-hipertensivas, antitrombóticas e doenças de má absorção.

## 9. A beta-caseína

A beta caseína é uma molécula composta por 209 aminoácidos codificada pelo gene *CSN2*, as quais as variantes mais comuns são derivadas dos alelos A1 e A2. Estudos indicaram que inicialmente, toda população bovina continha apenas o alelo A2 e que através de uma mutação surgiu o alelo A1 (JAISWAL et al, 2014). Esses alelos obedecem a uma relação de co-dominância.

Em bovinos, a beta caseína A1 e a A2 se diferenciam entre si pela substituição de um único aminoácido na posição 67 da cadeia, decorrente de uma mutação do tipo SNP, não sinônima, no éxon 7 do gene. O alelo A1 possui uma guanina enquanto o alelo A2 possui uma citosina. Essa mutação é não sinônima, isto é, realiza uma mudança de

aminoácido na estrutura da proteína, a variante A2 possui uma prolina enquanto que a variante A1 possui uma histidina (CAROLI et al, 2009).

O gene *CSN2* possui relação com características produtivas em bovinos. O alelo A2 aumenta os valores genéticos para produção de leite e diminui os valores genéticos para porcentagem de gordura (OLENSKI et al, 2010).

A frequência dos alelos varia consideravelmente entre as raças de bovinos, sendo as zebuínas aquelas com as maiores frequências do alelo A2 enquanto que as taurinas, possuem maiores frequências do alelo A1. Ganguly et al. (2013) reportaram uma frequência alélica do A2 de 0,94 para a raça zebuína Ongole, Anibal-Filho (2011) reportou para o Gir leiteiro uma frequência alélica de 0,95. Para os taurinos, a frequência do alelo A2 pode cair para 0,598 (KAMIŃSKI et al, 2006). Para animais da raça Sindi as frequências relatadas para o A1 e A2 respectivamente foram de 0,06 e 0,94 (SCHETTINI et al, 2019).

Para bubalinos, há dois relatos de possível fixação do alelo A2. Mishra et al. (2009) realizaram um estudo com 231 animais de 8 raças e constataram que em todos eles foram homozigotos para o alelo A2. Posteriormente, Ramesha et al. (2016) observaram que 47 machos Murrah e 25 machos da raça Surti também possuíam apenas o genótipo A2A2. Para que uma fixação fosse melhor avaliada, necessitar-se-ia de um maior número amostral por raça.

## **10. Impactos à saúde**

Após o consumo e digestão da beta caseína, é liberado no organismo um peptídeo bioativo chamado betacasomorfina-7, um composto opioide com potenciais benefícios e malefícios para a saúde humana. Watson et al. (2017) afirmam que esses compostos podem ter ação direta no sistema nervoso central, com efeitos analgésicos e tranquilizantes. No entanto, há controvérsias acerca do excesso deste componente na circulação sanguínea.

As pesquisas acerca da betacasomorfina vêm sendo realizadas há algumas décadas, como os realizados por Brantl et al. (1979) que relatam a identificação de novas variantes do peptídeo. Elliott et al. (1999) correlacionaram, a partir de um estudo ecológico, o consumo de leite a diabetes melitus tipo I.

Kamiński et al. (2007) realizaram uma revisão dos potenciais efeitos negativos à saúde que a betacasomorfina-7 pode causar e dentre eles estavam as doenças coronarianas, diabetes melitus, morte súbita infantil e até mesmo autismo. No entanto, dois anos antes, havia sido publicado um artigo sugerindo de que não há evidências suficientes para tais afirmações (TRUSWELL, 2005). A EFSA, em 2009, redigiu um relatório reportando a não-ligação direta entre o consumo do leite A1 e os diversos riscos à saúde.

Estudos *in vitro* apontam diferenças na motilidade e na inflamação gastrointestinal após o consumo do leite A1 e A2 devido à presença da betacasomorfina-7. Realizou-se um estudo piloto com duração de 8 semanas envolvendo 41 pessoas. Essas pessoas alternaram o consumo de produtos com as variantes da beta-caseína, com intervalos sem o consumo de laticínios. Foram relatadas dores abdominais e desconfortos intestinais maiores após o consumo do leite A1, em relação ao A2 (HO et al, 2014).

Outro experimento foi realizado, agora com 45 adultos que se identificaram como intolerantes à lactose os quais se dividiram dois grandes grupos: um que ingeria apenas “leite A1” e outro que apenas ingeria “leite A2”, leites com as variantes genéticas A1 e A2 respectivamente. Esses grupos alternavam o consumo a cada 14 dias, com um intervalo de 14 dias. Esse ciclo se repetiu duas vezes.

Os participantes, enquanto estiveram no período em que apenas consumiram o leite A1 relataram maior desconforto e maior trânsito gastrointestinal ao passo que, enquanto consumiram o leite A2 não sentiram um agravamento nos sintomas. Além desses sintomas, foram realizadas medidas de inflamação do trato gastrointestinal e foi observado que a inflamação do estômago e intestino delgado diminuiu em mais de 20% após a troca do leite A1 para o A2.

Dentre os participantes, 23 foram diagnosticados como intolerantes à lactose. Observou-se um agravamento dos sintomas à medida que o consumo da variante A1 da beta caseína se prolongava. Por outro lado, após o consumo da outra variante, não houve agravamento do quadro, os sintomas são comparáveis aos apresentados logo após o período de descanso, o intervalo de 14 dias (JIANQIN et al., 2016).

Esse mesmo grupo em novo estudo sobre o mesmo tema, levantou a hipótese de que sintomas agudos de intolerância à lactose podem estar relacionados não a própria lactose, mas sim a beta caseína A1 (para aqueles não diagnosticados) e que, a eliminação



da caseína evitaria os sintomas. Foram utilizados 600 candidatos em três cidades da China. Desse estudo, concluiu-se que o leite contendo apenas a variante A2 atenuou os sintomas relatados após a ingestão da variante A1. Sugere-se que a beta caseína A1 reduz a atividade da lactase e agrava os desconfortos gastrintestinais (HE et al, 2017).

Outro estudo envolvendo o leite A1/A2 foi realizado em atletas, com o objetivo de demonstrar que o consumo de leite A2 pode ser positivo para a recuperação muscular pós treino e uma alternativa aos intolerantes a beta-caseína A1 (KIRK et al., 2017).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BÚFALO. **As quatro raças no Brasil**, 2020. Disponível em:

<https://www.bufalo.com.br/home/o-bufalo/>. Acesso em: 29 jan. 2020.

Ahmad, S., F. M. Anjum, N. Huma, A. Sameen, e T. Zahoor. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with a particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 23, p. 62-74, 2013.

ASPICULETA-BORQUIS, R. R. B. Genetic parameter estimates for buffalo milk yield, milk quality and mozzarella production and Bayesian inference analysis of their relationships. **Genetics and molecular Research**, v. 9, 1636-1644, 2010a.

ASPILCUETA-BORQUIS, R. R. *et al.* Genetic parameters for buffalo milk yield and milk quality traits using Bayesian inference. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 5, p. 2195-2621, 2010b.

ASPILCUETA-BORQUIS, R. R. *et al.* Genetic paramaters for milk, fat and protein yields in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis* Artiodactyla, Bovidae) **Genetics and Molecular Biology**, n. 33, p. 71-77, 2010c.

BARKER, J. S. F. Water Buffalo: Domestication. **Encyclopedia of Global Archaeology**, NY, p. 7694-7697, 2014.

BASTIANETTO, Eduardo; ESCRIVÃO, Sidney Correa; OLIVEIRA, D. A. A. D. Influência das características reprodutivas da búfala na produção, composição e

qualidade do leite. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 1, p. 49-52, 2005.

BEJA-PEREIRA, A. *et al.* The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. **PNAS**, v. 103, n. 21, p. 8113-8118, 2006.

BENJAMIN, S. *et al.* Pros and cons of CLA consumption: an insight from clinical evidences. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 4, 2015.

BERNARDES, Otávio. Produção de Búfalas Leiteiras. **Anais do IV Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira (SIMLEITE)**, p. 279-316, 2013.

BERNARDES, Otávio. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.

LOTTSPREICH, F. *et al.* Novel Opioid Peptides Derived from Casein ( $\beta$ -Casomorphins). **Hoppe-Seyler's Z. Physiology Chem**, p. 1835-1839, 1980.

CAROLI, Anna Maria; CHESSA, Stefania; ERHARDT, Georg J. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5335-5352, 2009.

COCKRILL, W. Ross. The water buffalo: a review. **British Veterinary Journal**, v. 137, p. 8-16, 1981.

COLLI, L. *et al.* New Insights on Water Buffalo Genomic Diversity and Post-Domestication Migration Routes from Medium Density SNP Chip Data, **Frontiers in Genetics**, 2018.

DAYEM, A. *et al.* Genotyping of kappa-casein gene in Egyptian buffalo bulls. **Livestock Science**, v. 122, p. 286-289, 2009.

C, Du *et al.* Systematic analyses for candidate genes of milk production traits in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, v. 50, n. 3, p. 207-216, 2019.

EFSA. Review of the potential health impact of  $\beta$ -casomorphins and related peptides. **EFSA Journal**, 2009.

EL-HALAWANY, N. *et al.* Effect of complement component 5 polymorphisms on mastitis resistance in Egyptian buffalo and cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 119, p. 45-51, 2018.

ELLIOTT, R. *et al.* Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. **Diabetologia**, v. 42, Número, p. 292-296, 1999.

EMBRAPA. Anuário do Leite. **EMBRAPA**, São Paulo, 2018.

FAO. Buffalo Production and Research. **FAO**, Roma, 2005.

FAOSTAT, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QA/visualize>, 2017. Acesso em: 10/01/2020.

FILHO, A. E. V. Identificação de alelos para o gene da beta caseína na raça Gir leiteiro. **Apta Regional**, Campinas, 2011.

FIROUZAMANDI, M. *et al.* Genetic Variation of  $\beta$ -Casein Gene Using AS-PCR and ARMS-PCR Techniques in Bovine. **Russian Journal of Genetics**, v. 54, n. 11, p. 1352-1357, 2018.

INDRAJIT GANGULY *et al.* Beta-casein (CNS2) polymorphism in Ongole (Indian zebu) and Frieswal (HF x Sahiwal crossbreed) cattle. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 249-256, 2013.

Gu, M., *et al.* The single nucleotide polymorphism g.133A>C in the stearoyl CoA desaturase gene (SCD) promoter affects gene expression and quali-quantitative properties of river buffalo milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 442-451, 2019.

JENSSEN, Håvard; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial properties of lactoferrin. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 19-29, 2009.

HE, M. *et al.* Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled study. **Nutrition Journal**, v. 16, n. 1, 2017.

HO, S. *et al.* Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 994-1000, 2014.

HOLT, C. *et al.* Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6127-6143, 2013.

HRISTOV, P. J. *et al.* Effect of genetic polymorphism of  $\alpha$ S1- casein gene on qualitative and quantitative milk traits in native Bulgarian Rhodopean cattle breed. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 17, n. 1, 2018.

IBGE. Censo agropecuário 2017. **IBGE**, 2017. Disponível em: <[https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo\\_agro/resultadosagro/pecuaria.html](https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html)>. Acesso em: 28 Janeiro 2020.

IRANG, C.C. PHILIPINE CARABAO CENTER, 2018. **Excellence in carabao crossbreeding**. Disponível em: <https://www.pcc.gov.ph/in-san-agustin-isabela-excellence-in-carabao-crossbreeding>. Acesso em: 26 jan. 2020.

JAISWAL, Kailash; DE, Sachinandan; SARSAVAN, Anil. Detection of single nucleotide polymorphism by T-ARMS PCR of crossbred cattle Karan Fries for A1, A2  $\beta$ -casein types. **International Journal of Scientific Research in Biological Science**, v. 1, n. 1, 2014.

JIANQIN, S. *et al.* Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. **Nutrition Journal**, v. 15, 2016.

KAMIŃSKI, S.; RUŚĆ, A.; CIEŚLIŃSKA, A. A note on frequency of A1 and A2 variants of bovine beta-casein locus in Polish Holstein bulls. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 15, n. 2, p. 195-198, 2006.

KAMINSKI, Stanislaw; CIEŚLIŃSKA, Anna; KOSTYRA, Elżbieta. "Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 3, p. 189-198, 2007.

KIRK, B. *et al.* A2 Milk Enhances Dynamic Muscle Function Following Repeated Sprint Exercise, a Possible Ergogenic Aid for A1-Protein Intolerant Athletes? **Nutrients**, v. 9, n. 2, 2017.

- KOBA, Kazunori; YANAGITA, Teruyoshi. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 8, n. 6, p. 525-532, 2014.
- LEI, C. Z. *et al.* Independent maternal origin of Chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, v. 38, n. 2, p. 97-102, 2007.
- LEONARDI, M. *et al.* The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 88-97, 2012.
- JUN, L. *et al.* DGAT1 polymorphism in Riverine buffalo, Swamp buffalo and crossbred buffalo. **Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 4, p. 412-415, 2018.
- LIU, J. J. *et al.* Genome-wide association studies to identify quantitative trait loci affecting milk production traits in water buffalo **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 433-444, 2018.
- DAYEM, A. *et al.* Genotyping of kappa-casein gene in Egyptian buffalo bulls. **Livestock Science**, v. 122, Número, p. 286-289, 2009.
- MALHADO, C. H. *et al.* Parâmetros e tendências da produção de leite em bubalinos da raça Murah no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. 2, p. 376-379, 2007.
- MALHADO, C. H. *et al.* Estimativas de parâmetros genéticos para características reprodutivas e produtivas de búfalas mestiças no Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 4, p. 830-839, 2009.
- MANCINI, G. *et al.* Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and milk production traits in Italian Brown cattle. **Livestock Science**, v. 157, n. 1, p. 93-99, 2013.
- MICHELIZZI, V. N. *et al.* Water buffalo genome science comes of age. **International Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 333-349, 2010.
- MILLS, S. *et al.* Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 6, p. 377-401, 2011.
- MIN, S.; HARRIS, L. J.; KROCHTA, J. M. Antimicrobial Effects of Lactoferrin, Lysozyme, and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films

Incorporating the Lactoperoxidase System Against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. **Food Science**, v. 70, n. 7, m332-m338, 2006.

MISHRA, B. P. et al. Status of Milk protein,  $\beta$ -casein variants among Indian milch animals. **Indian Journal of Animal Science**, p. 772-725, 2009.

NAGARAJAN, M.; NIMISHA, K.; KUMAR, S. Mitochondrial DNA Variability of Domestic River Buffalo (*Bubalus bubalis*) Populations: Genetic Evidence for Domestication of River Buffalo in Indian Subcontinent. **Genome Biology and Evolution**, 2015.

NANDA, A. S.; NAKAO, T. Role of buffalo in the socioeconomic development of. **Animal Science Journal**, 2003.

OLENSKI, K. *et al.* Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein–Friesian bulls K. **Livestock Science**, p. 137-140, 2010.

OLIVEIRA, A. D. L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 29 , 2005.

PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W.; WENDORFF, W. L. **Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals**. [S.l.]: Blackwell Publishing, 2017.

PARODI, P. W. A Role for Milk Proteins and their Peptides in Cancer Prevention. **Current Pharmaceutical Design**, 2007.

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2012.

PRESICCE, G. A. **The Buffalo (*Bubalus bubalis*) – Production and research**. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2017.

RAMESHA, K. P. *et al.* Alpha-Lactalbumin Gene Polymorphism: A preliminary study on two breeds of the river Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 16, p. 47-52, 2008.

RAMESHA, K. P. *et al.* Genetic variants of  $\beta$ -casein in cattle and buffalo breeding bulls in Karnataka state of India. **Indian Journal of Biotechnology**, p. 178-181, 2016.

RAMOS, A. *et al.* Caracterização fenotípica e genética da produção de leite e do intervalo entre partos em bubalinos da Raça Murrah. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1261-1267, 2006.

RANJHAN, S. K. Buffalo as a social animal for humanity. **Italian Journal of Animal Science**, v.10, 2007.

SCHETTINI, G. *et al.* Genetic potential of Sindhi cattle for A2 milk production. **Animal Production Science**, 2019.

- SEDANO, C. Agência IBGE de notícias, 02 Agosto 2019. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/17932-maior-concentracao-de-bufalos-do-pais-ilha-do-marajo-esta-no-censo-agro>>. Acesso em: 31 Janeiro 2020.
- SISECIOGLU, M. *et al.* The prohibitive effect of lactoperoxidase system (LPS) on some pathogen fungi and bacteria. **African journal of pharmacy and pharmacology**, 2010.
- STELLA, A. A. S. *et al.* Expression profile of the CSF3 and LPO genes in milk from buffalo (*Bubalus bubalis*) with and without mastitis. **Molecular and Cellular Probes**, v. 41, 2018.
- STIPP, A. T. *et al.* Polimorfismos genéticos da kappa-caseína e da beta-lactoglobulina e produção de leite em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, 2013.
- TASHA, T. N. Comparison between bovine and buffalo milk yield in Pakistan. **Italian Journal of Animal Science**, v. 9 2007.
- TONHATI, H. *et al.* Parâmetros genéticos para a produção de leite, gordura e proteína em bubalinos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 29, n.1, p. 2051-2056, 2000.
- TONHATI, H. *et al.* Test-day milk yield as a selection criterion for dairy buffaloes (*Bubalus bubalis* Artiodactyla, Bovidae). **Genetic Molecular Biology**, n. 31, p. 674-679, 2008.
- TRUSWELL, A. S. The A2 milk case: a critical review. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2005.
- VARRICCHIO, M. L. *et al.* Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat. **Italian Journal of Animal Science**, 2007.
- VIGNE, J. D. The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere. **Comptes Rendus Biologies**, Fevereiro v. 11, 2011.
- WAHID, H.; ROSNINA, Y. **Husbandry of dairy animals**. [S.l.]: Elsevier, 2016.
- WANG, J. *et al.* Changes in milk yield and composition of colostrum and regular milk from four buffalo breeds in China during lactation. **Journal of Science Food Agriculture**, 2019.
- WATSON, R. R.; COLLIER, R. J.; PREEDY, V. R. **Nutrients in dairy and their implications for health and disease**. Londres: Elsevier, 2017.
- ZHANG, Y.; COLLI, L.; BAKER, J. S. F. Asian water buffalo: domestication, history and genetics. **Animal Genetics**, v. 15 2020.

ZICARELLI, L. *et al.* Influence of  $\alpha$ S1-casein and k-casein polymorphism on the curd yield of Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis* L.) milk. **International Dairy Journal**, 2020.



## **CAPÍTULO 2**

1 **SHORT COMMUNICATION: Buffaloes naturally produce A2 milk**

2 L. S. M. de Oliveira<sup>1</sup>, J. S. Alves<sup>1</sup>, M. S. Bastos<sup>1</sup>, V. A. R. da Cruz<sup>1</sup>, H. Tonhati<sup>2</sup>, R. B.  
3 Costa<sup>1</sup>, G. M. F. de Camargo<sup>1\*</sup>.

4 <sup>1</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia (UFBA),  
5 Salvador, BA, 40170-110, Brazil.

6 <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,  
7 Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil

8 \*corresponding author: gregorio.camargo@ufba.br

9 **ABSTRACT**

10 A beta-caseína é uma proteína do leite que possui dois tipos: A1 e A2. A beta-  
11 caseína A1 tem a digestão dificultada em algumas pessoas e causa desordens  
12 gastrintestinais. Como alternativa surgiu o leite A2 que possui somente a outra beta-  
13 caseína e é obtido a partir de fêmeas cujo genótipo para o gene é A2A2. Em bovinos, as  
14 frequências alélicas e genotípicas variam de acordo com a raça e faz-se seleção assistida  
15 por marcadores para obtenção de animais A2A2 e consequente produção de leite A2 cuja  
16 digestão é facilitada. Esse estudo teve como objetivo avaliar a condição da espécie  
17 bubalina para esses alelos da beta-caseína. Foram genotipados 657 búfalos de quatro raças  
18 diferentes e todos os animais apresentaram genótipo A2A2, ou seja, o alelo A2  
19 apresentou-se fixado na espécie bubalina. Todo produto lácteo de búfalo é, portanto,  
20 naturalmente A2. Esse resultado representa uma valorização de mercado para os produtos  
21 manufaturados com leite da espécie.

22 **Key words:** beta-casein, SNP, fixation, non-cattle species

23 **Short communication**

24 A beta-caseína é uma proteína do leite que possui dois tipos: A1 e A2. A digestão  
25 da beta-caseína A1 forma um peptídeo bioativo chamado betacasomorfina-7. Ele leva a  
26 um aumento de desordens gastrintestinais semelhantes à intolerância a lactose em  
27 algumas pessoas. Além disso, a alteração dos biomarcadores de inflamação sérica  
28 aumenta o trânsito intestinal e agrava os sintomas dos intolerantes à lactose. Surge como  
29 alternativa a ingestão de leite A2 que não causa esses transtornos (Jianqin et al 2016 e He  
30 et al. 2017). O leite A2 é obtido da ordenha de animais cujo genótipo para o gene da beta-  
31 caseína é A2A2 e, portanto, não possui a beta-caseína A1.

32 Em bovinos, a beta-caseína A1 e a A2 se diferenciam pela substituição de um  
33 aminoácido na posição 67 de suas cadeias. Na beta caseína A2 existe uma prolina  
34 enquanto na beta caseína A1 existe uma histidina. Essa mutação não-sinônima é  
35 decorrente de uma mutação do tipo SNP no éxon 7. O alelo A1 possui uma guanina  
36 enquanto que o da beta caseína A2 possui uma citosina (Caroli et al. 2009). As frequências  
37 dos alelos variam consideravelmente entre raças, tendo as raças zebuínas frequências  
38 alélicas do A2 maiores do que as taurinas (Zepeda-Batista et al., 2015; Schettini et al.,  
39 2019). Rebanhos bovinos são selecionados por marcadores moleculares para produção de  
40 leite A2. Para bubalinos, há relatos que todos os animais são A2A2, mas o número de  
41 animais genotipados por raça é pequeno para confirmação da fixação do alelo. Os  
42 indivíduos testados foram de oito a 49 por raça (Mishra et al., 2009; Ramesha et al., 2016).

43 Assim, o objetivo do presente estudo é comprovar a fixação do alelo A2, na  
44 espécie bubalina, permitindo o uso de estratégias de marketing para adicionar valor aos  
45 derivados lácteos de búfalas.

46 Foram utilizados no experimento 657 búfalos das quatro raças reconhecidas pela  
47 Associação Brasileira de Criadores de Búfalos: Murrah (n=467), Jafarabadi (n=74),  
48 Mediterrâneo (n=80) e Carabao (n=36). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no

49 Uso de Animais da EMVZ-UFBA sob numeração 81/2018. Os animais da raça Murrah  
50 tiveram seus genótipos cedidos por criador que genotipou seus animais no laboratório  
51 comercial Gene Genealógica AGCT LTDA. Para as raças Jafarabadi e Mediterrâneo,  
52 foram coletados pelos da vassoura da cauda dos quais se extraíram DNA pelo kit  
53 comercial Nucleo Spin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Para a raça Carabao,  
54 utilizou-se DNA do banco de germoplasma previamente extraído dos indivíduos da raça  
55 Carabao foi disponibilizado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária em acordo  
56 de transferência de material (23066.043532/2019-91).

57 O primers foram desenhados baseado na sequência FN424088.1 (GenBank,  
58 NCBI) do gene da beta-caseína em bubalinos, utilizando a ferramenta online Primer 3  
59 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). As sequências dos primers são: foward 5'-  
60 CCCCAAACAATTTCTTAACCA-3' e reverse 5'-AGACTGGAGCAGAGGCAGAG-  
61 3'. O fragmento amplificado possui um tamanho de 447pb. Para a amplificação dos  
62 fragmentos de interesse, foi utiliza uma solução com um volume final de 20 µL. Essa  
63 solução contém 1,5 µL do DNA (105ng), 8,8µL de GoTaq Colorless master mix e 2,0 µL  
64 de cada um dos *primers* (10 pM). O ciclo de amplificação seguiu as seguintes condições:  
65 desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos com temperatura de  
66 desnaturação de 95°C por 1min e temperatura de anelamento de 54°C e extensão a 72°C  
67 por 1min, com extensão final de 72 °C por 5 min em termociclador Applied Biosystems.

68 Os produtos amplificados foram purificados utilizando polietilenoglicol (PEG  
69 8000). A reação de sequenciamento foi realizada em um sequenciador 3500xL Genetic  
70 Analyzer, Applied Biosystems <sup>TM</sup> utilizando o primer reverse. As sequências foram  
71 analisadas no software CodonCode Aligner disponível em  
72 <http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>. As sequências para cada raça foram

73 depositadas no Genbank sob os números de acesso MN996234, MN996235, MN996236  
74 e MN996237.

75 Observou-se que todos os 657 bubalinos do presente estudo são homozigotos A2A2  
76 para o gene beta caseína. Mishra et al. (2009) e Ramesha et al. (2016) realizaram estudos  
77 com 231 e 72 búfalos, respectivamente, em nove raças de bubalinos diferentes e  
78 encontraram o mesmo resultado. Todavia a quantidade de animais por raça era pequena  
79 (variando de oito a 49). Com o presente resultado, trabalhando com um maior número de  
80 animais no total e por raça, podemos indicar a fixação do alelo A2 na espécie.

81 Esses resultados têm grande importância para os produtores de bubalinos, pois a  
82 fixação do alelo A2 indica que não há a necessidade de seleção assistida para produção  
83 de leite A2, pois as búfalas produzem naturalmente A2. Todas possuem o genótipo A2A2.

84 A fixação do alelo A2 na espécie bubalina vai de encontro ao fato que indica que a  
85 mutação que originou o alelo A1 ocorreu só em bovinos há 10.000 anos, sendo o alelo  
86 A2 o ancestral (Jaiswal et al 2014; Formaggioni et al 1999). Seria interessante averiguar  
87 se a fixação ocorre em outros mamíferos domésticos usados para produção de leite.

88 No caso do Brasil (e talvez de outros países), a Associação de Criadores de Búfalos  
89 confere um selo de pureza para laticínios cujos produtos são manufaturados somente com  
90 leite de búfalas. O fato de o alelo ser fixado na espécie, garante que o produto com selo  
91 de pureza também é A2. Isso adiciona valor aos produtos lácteos da espécie.

92 Além da fixação do alelo A2, observou-se um SNP C/G não-sinônimo no mesmo  
93 éxon do gene da beta-caseína em búfalos. Esse SNP altera o aminoácido da posição 71  
94 da cadeia de uma lisina (G) para uma aspargina (C). As frequências alélicas encontradas  
95 para uma população de 208 animais analisados foram de  $f(G)=0,66$  e  $f(C)=0,34$ .  
96 Frequências diferentes foram encontradas entre as raças. Para a raça Jafarabadi  $f(G)=0,56$   
97 e  $f(C)=0,44$ , para a raça Mediterrâneo foram de  $f(G)=0,98$  e  $f(C)=0,02$  e para a raça

98 Carabao foram de  $f(G)=0,19$  e  $f(C)=0,81$ . Animais da raça Murrah não possuem genótipo  
99 para esse SNP, pois a genotipagem para os alelos A1/A2 foi feita em empresa privada.  
100 As frequências variam bastante entre raças, indicando que a constituição do gene da beta-  
101 caseína tem efeito de raça.

102 O alelo A2 do gene da beta-caseína está fixado na espécie bubalina, portanto búfalas  
103 produzem naturalmente leite A2. A constatação desse fato adiciona valor a  
104 comercialização dos produtos lácteos da espécie, visto que produtos A2 possuem digestão  
105 facilitada e um apelo de mercado. Estudos genéticos similares com outras espécies  
106 domésticas leiteiras devem ser conduzidos a fim de se validar essa constatação também  
107 para elas.

108

109

#### ACKNOWLEDGMENTS

110 Os autores agradecem aos produtores: Mariel Fujissawa, Renato Amaral, Antônio  
111 Peixoto, Urbano Souza Filho e Jonas Assumpção pela disponibilidade de coleta de  
112 material biológico. Agradecemos à Embrapa para disponibilização de parte das amostras  
113 de DNA utilizadas. Agradecemos ao proprietário Francisco Veloso pela concessão dos  
114 genótipos dos animais do seu rebanho. Agradecemos ao CNPq pelo suporte financeiro  
115 com projeto sob numeração 400227/2016-9 e à Fapesb pela concessão da bolsa de estudos  
116 da primeira autora.

117

118

#### REFERENCES

119 Caroli, A. M., Chessa, S., Erhardt. 2009. Invited review: Milk protein polymorphisms in  
120 cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. J. Dairy Sci. 92: 5335-5352.  
121 <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>.

- 122 He, M., Sun J., Jiang, Z. Q., Yang, Y. X. 2017. Effects of cow's milk beta-casein variants  
123 on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled  
124 study. *Nutr. J.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12937-017-0275-0>.
- 125 Sun, J., Leiming X., Lu X., Yelland, W. G., Ni, J. and Clarke A. Effects of milk containing  
126 only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on  
127 gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people  
128 with self-reported intolerance to traditional cows' milk. 2016. *Nutr. J.*, 15.  
129 <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0147-z>.
- 130 Mishra, B. P., Mukesh M., Prakash B., Sodhi, M., Kapila, R., Kishore, A., Kataria, R. R.,  
131 Joshi B. K., Bhasin V., Rassol, T. J. and Bujarbaruah K. M. 2009. Status of Milk protein,  
132  $\beta$ -casein variants among Indian milch animals. *Indian J Anim Sci.* 79: 722-725.
- 133 Ramesha, K. P., Rao, A., Basavaraju, M., Alex, R., Katakataware, M. A., Jeyakumar, S.  
134 and Varalakshmi, S. 2016. Genetic variants of  $\beta$ -casein in cattle and buffalo breeding  
135 bulls in Karnataka state of India. *Indian J. Biotechnol.* 15: 178-181.
- 136 Schettini, G. P., Lambert, S. M., Souza, B. M. P. S., Costa, R. B., and Camargo, G. M. F.  
137 2019. Genetic potential of Sindhi cattle for A2 milk production. *Anim Prod Sci.*  
138 (Accepted for publication).
- 139 Zepeda-Batista, J. L., Alarcón-Zúñiga, B., Ruíz-Flores, A., Núñez-Domínguez, R., and  
140 Ramírez-Valverde, R. 2015. Polymorphism of three milk protein genes in Mexican Jersey  
141 cattle. *Electron. J. Biotechnol.* 18: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.10.002>.