



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO MELHORAMENTO GENÉTICO NA QUALIDADE
DO LEITE

Rafaela de Souza Melo Castro

Orientadora: Isabel Cristina Braga Rodrigues

Ouro Branco- MG - Brasil
Agosto/2017

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO MELHORAMENTO GENÉTICO NA QUALIDADE DO LEITE

Rafaela de Souza Melo Castro

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às exigências
do Curso de Bacharelado em Engenharia de
Bioprocessos da Universidade Federal de
São João del-Rei.

Orientadora: Isabel Cristina Braga Rodrigues

Ouro Branco- MG - Brasil
Agosto/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO MELHORAMENTO GENÉTICO NA QUALIDADE
DO LEITE**

Rafaela de Souza Melo Castro

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Isabel Cristina Braga Rodrigues – Orientador

Katialaine Corrêa de Araújo – Examinador 1

Brener Magnabosco Marra – Examinador 2

Ouro Branco, 31 / 08 / 2017

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da minha caminhada durante essa fase tão importante da minha vida.

À minha família, por me proporcionarem todo amor e suporte necessários para que eu pudesse concluir mais essa etapa de minha vida. Mesmo com toda distância geográfica, vocês sempre se fazem presentes e realizam meus sonhos.

Ao meu namorado Ricardo, por ser o melhor companheiro em tudo que preciso.

À minha orientadora de estágio Marta Fonseca Martins, pela oportunidade ímpar na minha formação e pelos ensinamentos.

Aos estudantes do laboratório de Genética Molecular da EMBRAPA Gado de Leite, pelo carinho com que me acolheram, pela paciência com que me ensinaram e pelo exemplo de profissionais admiráveis que levarei por toda a vida.

À Coordenadoria de Engenharia de Bioprocessos da UFSJ, pela enorme carga de conhecimento, incentivo e exemplo, me possibilitando a preparação para formação profissional e pessoal.

À minha eterna mestre e orientadora, Isabel, por ser minha inspiração dentro da Engenharia de Bioprocessos.

RESUMO

O setor leiteiro contribui significativamente para o mercado brasileiro, uma vez que há um grande número de propriedades rurais, bem como uma alta demanda por consumo de produtos lácteos. Uma forte perspectiva neste cenário é a introdução da seleção do rebanho leiteiro por melhoramento genético, sendo a busca pela qualidade do leite uma crescente demanda atual. Desta forma, torna-se imprescindível a avaliação do impacto do melhoramento genético na qualidade do leite. A qual se dá primordialmente pela composição do mesmo, sendo que as proteínas do leite influenciam diretamente na qualidade da produção de produtos lácteos, especialmente queijos. As três principais proteínas do leite são kappa-caseína, β -lactoglobulina e β -caseína. Sendo que as duas primeiras estão ligadas a melhor qualidade nutricional e de produção de derivados. Enquanto que a última, além de influenciar na qualidade do leite, está associada a doenças, como problemas coronarianos, alergias e diabetes *mellitus*. Países mais desenvolvidos como Nova Zelândia e E.U.A já introduziram em seu sistema uma remuneração para quem investe em qualidade do leite. Neste cenário, o Brasil ainda se encontra em situação arcaica quando comparado com demais países, pois a indústria brasileira ainda não bonifica por sólidos de leite, como proteína e gordura, fazendo com que não seja rentável para os produtores investirem na qualidade do produto. Neste trabalho, aplicaram-se formulários via e-mail e ligações telefônicas tanto para produtor quanto para empresas de genotipagem animal. Este levantamento permitiu concluir que um fator crucial é a falta de conscientização dos produtores e também dos laticínios quanto a importância da qualidade do leite através de benefícios atribuídos às proteínas do leite. No entanto, há uma perspectiva acentuada de valorização da genotipagem de proteínas do leite através de técnicas de biologia molecular, visto que empresas do ramo evidenciam um aumento dessas pesquisas e investimentos por parte do mercado. Logo, uma maior disseminação de toda cadeia leiteira da importância de se produzir qualidade do leite, paralelo ao potencial brasileiro de produção de leite, fará com que o Brasil se torne mais competitivo no mercado e também seja capaz de produzir com maior rendimento e qualidade seus produtos lácteos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 Setor Leiteiro	12
3.2 Melhoramento Genético	13
3.3 Proteínas do Leite.....	16
3.2.1 Caseínas	17
a) κ -caseína	18
b) β -caseína.....	19
3.2.2 β -lactoglobulina	21
3.3 Processos laboratoriais de Genotipagem.....	22
3.3.1 Extração de DNA	22
3.3.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	24
a) PCR convencional e análise dos padrões de restrição	25
b) PCR em Tempo Real	27
3.4 Impacto Econômico da Genotipagem das Proteínas do Leite.....	32
4 METODOLOGIA.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Polimorfismo do aminoácido 67 nas variantes A1 e A2 da β -caseína. Fonte: USPRP, 2016.....	20
Figura 2: Separação das frações do sangue bovino (plasma, leucócitos e hemácias) após centrifugação. Fonte: MD SAÚDE, 2015.....	23
Figura 3: Pellet de DNA após precipitação a partir de um protocolo de extração de DNA de sangue bovino. Fonte: O Autor, 2017.....	24
Figura 4: Gel de agarose após revelação de PCR para β -lactoglobulina. Fonte: O Autor, 2017.....	26
Figura 5: Gel de Poliacrilamida após revelação de digestão dos amplicons para os alelos de β -lactoglobulina com a enzima HaeIII, conforme tabela 3.1. Fonte: O Autor, 2017.....	27
Figura 6: Análise da curva de amplificação para o genótipo A1A1 da β -caseína. Linha azul: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.....	29
Figura 7: Análise da curva de Dissociação para o genótipo A1A1 da β -caseína. Linha vermelha: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.	29
Figura 8: Análise da curva de amplificação para o genótipo A2A2 da β -caseína. Linha azul: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.....	30
Figura 9: Análise da curva de Dissociação para o genótipo A2A2 da β -caseína. Linha vermelha: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.	30
Figura 10: Análise da curva de amplificação para o genótipo A1A2 da β -caseína. Linha azul: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.....	31
Figura 11: Análise da curva de Dissociação para o genótipo A1A2 da β -caseína. Linha vermelha: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrão de restrição esperado dos fragmentos digeridos para os alelos de β -lactoglobulina com a enzima HaeIII.	26
Tabela 2 – Padrão de restrição esperado dos fragmentos digeridos para os alelos de κ -caseína com a enzima HinfI.	26
Tabela 3 - Respostas coletadas através da pesquisa realizada com as empresas de genotipagem bovina.	37

1 INTRODUÇÃO

No decorrer dos anos, o setor leiteiro brasileiro vem sofrendo um intenso processo de especialização da produção. Em contrapartida, em relação a qualidade e composição do leite, ainda há muito a fazer em comparação a países que já participam ativamente do mercado internacional. Uma matéria-prima de melhor qualidade e composição está associada a um maior rendimento industrial, o que permite otimizar custos de produção e oferecer produtos de melhor qualidade ao consumidor, com consequente aumento da competitividade do leite e derivados nacionais, principalmente quando se almeja um crescimento nas exportações. Além disso, com a melhoria da qualidade pode-se atender às exigências crescentes de um consumidor a cada dia mais esclarecido (BRITO, 2010).

O leite bovino tem sete vezes mais proteínas do que o leite humano. As principais proteínas do leite são as caseínas, albuminas e globulinas. Além da importância para a alimentação humana, um aspecto de interesse à indústria reside no envolvimento das proteínas na formação do coalho para produção de queijo (MORRIS *et al.*, 2008).

O melhoramento genético traz benefícios significativos para a produção de leite, sendo eles permanentes e cumulativos. Entretanto, esses ganhos são demorados devido ao longo intervalo de gerações dos bovinos. Desta forma, é importante que os objetivos de seleção sejam determinados com cautela e os programas de melhoramento devem estar atentos às tendências do mercado futuro, para que os produtores alcancem seus objetivos de usufruírem de bonificações e se tornarem competitivos no mercado (RUBEZ, 2004).

Com os avanços da biotecnologia tornou-se possível obter informações de importância estratégica e elevado valor econômico sobre o genótipo dos animais para o melhoramento por meio de seleção. Sendo assim, o produtor pode orientar os acasalamentos, a escolha do sêmen e adicionar a informação dos marcadores moleculares para o melhoramento genético do rebanho de acordo com a demanda de seu mercado (VERNEQUE *et al.*, 2008).

A seleção para altas porcentagens de gordura e proteína deve estar associada a bons volumes de produção leiteira, pois a produção de leite tem correlação alta e negativa com o teor de sólidos do leite, ou seja, quanto maior o volume, menor o teor de sólidos. Assim, torna-se crucial uma política de conscientização e bonificação dos produtores para se produzir leite com maior teor de sólidos e, portanto, deve-se avaliar a relação custo e benefício desse investimento, ou seja, se a indústria valorizará este esforço. O pagamento do leite por qualidade, com a inclusão da proteína e da gordura no esquema de pagamento. Tal cenário já é uma realidade em diversos países, enquanto que no Brasil vem sendo executado aos poucos por algumas indústrias do setor de lácteos, tendo uma próspera perspectiva futura (MADALENA, 2008).

O melhoramento genético do rebanho pode propiciar melhorias na qualidade do leite, no entanto, cabe ao produtor a difícil tarefa de definir corretamente seus objetivos, suas metas, adotar as tecnologias acessíveis, utilizar genótipos adequados e a arte de manejar corretamente seu rebanho. Paralelamente, o mercado deve valorizar e bonificar os produtores que atenderem tal demanda para que seja vantajoso para toda a cadeia do setor leiteiro. Desta forma, poderá garantir a produção de leite de qualidade e a baixo custo, atendendo aos anseios da indústria e dos consumidores e permitindo sua permanência sustentável na atividade leiteira (STOOP *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto do melhoramento genético na qualidade do leite através de levantamento bibliográfico e questionário aplicado a empresas de genotipagem bovina.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Efetuar levantamento bibliográfico sobre os processos de genotipagem de proteínas do leite e sua aplicação para melhoramento genético de gado leiteiro.
- b. Efetuar levantamento bibliográfico sobre os impactos econômicos na produção de leite a partir da utilização de melhoramento genético para proteínas do leite.
- c. Fazer levantamento de empresas de genotipagem bovina, especializadas em proteínas do leite.
- d. Aplicar questionário para empresas de genotipagem bovina e a um produtor de leite de médio porte.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Setor Leiteiro

De acordo com estudos realizados por técnicos da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), o setor agropecuário brasileiro apresenta uma tendência favorável com rentabilidade positiva e recuperação de margens para 2017, o que é distinto à queda do PIB que encolheu 3,8% em 2015, mas em relação ao setor leiteiro subiu 1,8% (CANAL RURAL, 2016). Desta forma, o setor leiteiro passa por um momento de aumento de produção no Brasil e enfrenta, ao mesmo tempo, uma pressão crescente para melhoria de qualidade do leite (REDES, 2017).

O setor leiteiro tem um importante papel na ordem econômica e social do agronegócio brasileiro, com uma participação significativa no PIB da pecuária. A produção nacional de leite em 2015, estimada em 34 bilhões de litros, coloca o Brasil em quarto lugar no ranking mundial dos países produtores (ZOCCAL, 2016). O setor produtivo conta com um universo de 1,3 milhão de propriedades leiteiras, distribuídas praticamente em todo o território nacional (IBGE, 2006; ZOCCAL *et al.*, 2012).

Estima-se que a produção mundial de leite em 2022 chegará a 1 trilhão de litros de leite e a América Latina estará contribuindo com boa parte da demanda prevista para erradicar a fome no mundo até 2025 (FAO, 2013), sustentado pelo fato de que a produção de leite nos principais países produtores será maior do que o aumento da população (IFCN, 2014). A produção de leite no Brasil considerada para 2023, será de 46,7 bilhões de litros, com crescimento anual de 3,2%, 42% superior ao registrado em 2012 (OUTLOOK, 2013).

Em vista disto, há uma necessidade cada vez maior de se produzir alimentos derivados de bovinos com qualidade superior, em grande escala, a custos cada vez menores. Para manter a competitividade comercial desses produtos, a agroindústria brasileira tem investido em programas de melhoramento genético buscando aumentar a eficiência da produção, a padronização dos animais e de seus produtos (GARCIA e PORTO-NETO, 2006).

As estatísticas e os exercícios de futurologia são importantes ferramentas para corrigir rotas. Neste cenário, a Embrapa Gado de Leite é otimista em relação aos cenários futuros para a produção leiteira (EMBRAPA, 2012). Isto porque a pesquisa agropecuária tem construído fundamentos bastante sólidos para contribuir com o crescimento contínuo e sustentável da atividade leiteira no país garantindo ganhos reais de produtividade. A seleção genômica tem sido aplicada nos programas de melhoramento genético de raças bovinas leiteiras, o que permitirá identificar e retirar do processo de seleção os indivíduos portadores de alelos indesejáveis relacionados a algumas doenças hereditárias (VILELA e RESENDE, 2015).

Programas que visem à identificação de reprodutores com desempenho positivo em produção de leite e em outras características de importância econômica, normalmente, são fundamentados no teste de progênie. O qual consiste em uma metodologia de avaliação dos touros pelo desempenho produtivo de suas filhas em vários rebanhos, produzidas por acasalamentos aleatórios, com sêmen codificado, em rebanhos puros e mestiços (GUZERÁ, 2017). Esse teste é a prova zootécnica mais segura para identificar os valores genéticos preditos de touros e promover o melhoramento genético em rebanhos leiteiros. A inclusão de marcadores moleculares ao processo de seleção pode duplicar os ganhos genéticos e diminuir em até 92% os custos de testes de progênie tradicionais (SCHAEFFER, 2006)

No Brasil, estima-se que o gasto para obter a prova de um touro é de cerca de US\$ 125 mil. Com a implantação da seleção genômica nas raças zebuínas e no Girolando esse custo poderá ser reduzido para, aproximadamente, US\$ 200 por touro, refletindo não só na redução dos gastos com teste de progênie, mas também na maior disponibilidade de indivíduos de alto valor genético a uma idade mais precoce, impactando diretamente no ganho genético dos rebanhos e no aumento da produção de leite no Brasil (SILVA, 2012).

3.2 Melhoramento Genético

O melhoramento genético animal consiste na seleção da composição genética das populações, com base em duas estratégias fundamentais, a triagem e

os sistemas do acasalamento, que exploram a variabilidade biológica dos animais dentro das espécies. Com essas duas estratégias, procura-se utilizar de maneira criativa as diferenças genéticas existentes entre indivíduos dentro de uma raça e entre raças dentro de uma espécie, organizando acasalamentos visando à obtenção de melhor combinação aditiva e não-aditiva nos animais do sistema (ALENCAR, 2004).

O objetivo do melhoramento genético animal é alterar geneticamente populações de animais. Faz-se isto no intuito de aumentar a frequência de genes (ou alelos) e de genótipos desejáveis, com o consequente reflexo favorável no mérito fenotípico médio de características destas populações que sejam importantes economicamente (BERGMANN, 1994)

Os diversos avanços provindos de áreas das ciências e afins influenciam constantemente as perspectivas para o melhoramento genético das diferentes espécies animais. Da mesma forma que a era da biotecnologia tem despertado grandes expectativas quanto aos seus efeitos no melhoramento genético animal, tanto na teoria quanto na prática (PACKER e PAZ, 2001).

Packer e Paz (2001) defendem que a aplicação dos conhecimentos biológicos contribui significativamente no melhoramento genético animal sob dois grandes enfoques, o primeiro compreendendo as tecnologias da reprodução animal, as quais operam ao nível das células (espermatozoides e óvulos), ovo e embrião, e o segundo, as técnicas moleculares, que podem ser usadas para localizar, identificar, comparar e eventualmente manipular os genes, operando, portanto, ao nível do DNA.

Atualmente, o Brasil apresenta um cenário elitista em relação ao melhoramento genético, visto que beneficia apenas os criadores que possui propriedades maiores, sendo estes os detentores dos melhores genótipos e de condições socioeconômicas mais privilegiadas. Desta forma, os criadores comerciais detêm acesso aos animais geneticamente superiores, além de apresentarem uma cultura no sentido de propiciar condições ambientais adequadas, ao mesmo tempo recebendo, em troca, preços justos pelo trabalho e investimento quando remunerados pela composição do leite (WIGGANS, 1991).

Os exemplos alcançados na produção animal em outros países são notórios com o passar dos anos. Com a introdução do melhoramento genético, países como os E.U.A, por exemplo, em 1945, apresentavam produção média de leite de 2.023 kg/vaca/ano; atingindo, em 1982, 5.900 kg/vaca/ano. A taxa de aperfeiçoamento de programas de melhoramento genético para produção de leite tem aumentado linearmente com o correr dos anos, neste país. Por exemplo, vacas nascidas em 1986 foram, aproximadamente, 135 kg superiores, em valores genéticos, em produção de leite do que as nascidas em 1985 (WIGGANS, 1991). Este sucesso é devido, em grande parte, à massificação dos programas de avaliações genéticas, onde o número de vacas que participam anualmente dos programas supera dois milhões (PEREIRA, 2008).

Em gado de leite, a produção por vaca, no estado americano de Nova York, tomado como exemplo, aumentou 10179 libras desde 1961 até 2004. O aumento atribuído à genética foi de 4331 libras, responsável por 42% do melhoramento total de produção (EVERETT, 2004).

A busca de genótipos mais produtivos e mais compatíveis com as condições ambientes prevalentes no Brasil é preocupação de todos melhoristas animais. Para isto, é prioritário o estabelecimento de programas estáveis de ação, amparados com suportes financeiros adequados e maior conscientização dos criadores da necessidade de se aumentar a produção e a produtividade dos rebanhos. Recursos genéticos estão disponíveis em abundância. O que é necessário é a intensificação de processos de identificação dos genótipos superiores e multiplicação dos mesmos para todos os estratos de criadores (PEREIRA, 2008).

Nos países desenvolvidos, onde a genética animal é vigorosa ferramenta no melhoramento da produção, as taxas anuais de ganhos genéticos pela seleção variam, em média, de 1-2%. Na situação brasileira, os valores são bem mais tímidos, principalmente por razões educativas que resultam da pouca sensibilidade dos criadores e das Associações de Raça pela massificação dos programas de melhoramento genético. A despeito dessa restrição, os esforços de intensificação das avaliações genéticas em curso em diferentes raças merecem destaque, visto

que são executadas por Associações de Raça e em parceria com universidades e/ou instituições de pesquisa (PEREIRA, 2008).

3.3 Proteínas do Leite

A seleção baseada no genótipo tornou-se importante na criação de bovinos. Os marcadores moleculares surgiram como uma ferramenta capaz de detectar variações genéticas no DNA (YANG *et al.*, 2013). Eles podem ainda ser usados para associar a variação genética a uma característica de interesse. O uso de marcadores de DNA permite identificar o potencial genético de um animal antes da expressão do seu fenótipo (REGINATO e COUTINHO, 2001). Atualmente, uma das utilizações dos marcadores moleculares no Teste de Progênie consiste na identificação de indivíduos portadores de variantes de genes aditivos para maior percentual de gordura e de proteína no leite (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

O leite é um produto de alto valor biológico que contém mais de cem substâncias que estão em solução, suspensão ou emulsão em água. Dentre essas substâncias se destacam as proteínas. A concentração de proteína no leite varia de 3,0 a 4,0% (30–40 gramas por litro). Este percentual varia com a raça da vaca e com a proporção da quantidade de gordura no leite, uma vez que há relação direta entre a quantidade de gordura e a quantidade de proteína, ou seja, quanto mais alto o teor de gordura, mais alto o teor de proteína (WATTIAUX, 2014).

Aspectos associados à variação do leite podem ser atribuídos às diferentes variações genéticas observadas entre as espécies, raças, e mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie. Estudos no campo da biologia molecular têm permitido mapear e identificar os genes responsáveis por essa variação no leite. Até então, os casos mais intensamente investigados para compreender a variação de composição entre os leites se referem aos genes que codificam as proteínas do leite. Polimorfismos nestes genes causam diferenças na composição e no teor de proteína, ambos afetando a composição do leite e suas propriedades tecnológicas (GODDARD, 2001).

As proteínas do leite são veículos naturais, que fornecem micronutrientes essenciais (cálcio e fósforo), aminoácidos, assim como componentes do sistema imune (imunoglobulinas e lactoferrina), para o recém-nascido. Essas proteínas são distribuídas em duas grandes classes, 80% de caseína e 20% de proteínas do soro, percentual que pode variar em função da raça dos animais, da ração fornecida e do país de origem (LIVNEY, 2010).

As proteínas do soro são um grupo de proteínas que permanecem solúveis no soro do leite após a precipitação da caseína a pH 4,6 e temperatura de 20°C (FARRELL JR *et al.*, 2006). A maioria dessas proteínas são globulares, com elevada hidrofobicidade e cadeias peptídicas densamente dobradas. Os dois componentes principais das proteínas do soro são α -lactalbumina e β -lactoglobulina (PHADUNGATH, 2005).

As caseínas são as principais proteínas do leite, compreendem cerca de 80% das proteínas do leite e consistem de quatro proteínas principais: α 1-, α 2-, β - e κ -caseína, as quais possuem elevada estabilidade térmica, o que proporciona às indústrias de laticínios realizar o tratamento do leite a temperaturas elevadas, como o leite UAT (Ultra Alta Temperatura) (BRASIL, 2015).

As proteínas κ -caseína, β -caseína e β -lactoglobulina serão discutidas nesse trabalho, pois são as proteínas de maior impacto na qualidade do leite (NG-KWAI-HANG *et al.*, 2002).

3.2.1 Caseínas

A função biológica das caseínas na glândula mamária é transportar cálcio, fosfato e proteína para o neonato (DE KRUIF e HOLT, 2003), consistem de quatro proteínas principais: α 1-, α 2-, β - e κ -caseína, representando cerca de 40%, 10%, 35% e 15% do total de caseínas, respectivamente, as quais são constituídas por 199, 207, 209 e 169 resíduos de aminoácidos, com pesos moleculares de 23, 25, 24 e 19 kDa, respectivamente (GOFF, 2009) e cerca de 8% de fosfato de cálcio coloidal (DALGLEISH, 2011). As caseínas são moléculas anfipáticas por possuírem regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (DE KRUIF e GRINBERG, 2002).

Do ponto de vista da indústria, as caseínas são os componentes mais importantes do leite, uma vez que as propriedades nutricionais, sensoriais e de textura, dos principais produtos lácteos, como leite fluido, queijo e iogurte derivam das propriedades das caseínas (DE KRUIF *et al.*, 2012).

a) κ -caseína

A κ -caseína é uma glicoproteína e possui apenas um grupo fosfoserina, sendo, dessa forma, estável na presença de íons de cálcio e assumindo importante papel na estabilidade da micela de caseína (WALSTRA, 1999). Uma vez que a caseína é a principal responsável pelo rendimento na fabricação de queijos, a fração nitrogenada do leite se torna uma característica particularmente importante para a fabricação de derivados lácteos (EMMONS *et al.*, 2003). O gene que codifica para a κ -caseína tem dois alelos constituintes, o A e o B (MUÑOZ e ALVAREZ, 2009).

Segundo Bordim *et al.* (2001), a participação da κ -caseína na composição proteica do leite justifica pesquisas sobre a correlação deste polimorfismo com a produção, assim como a composição deste. Visto que grande parte das pesquisas desenvolvidas demonstra que o alelo B da κ -caseína em bovinos está correlacionado com maior produção de proteínas no leite, quando comparados ao alelo A (MEDRANO e AGUILARCORDERO, 1990; VAN EENENNAAM e MEDRANO, 1991a; VAN EENENNAAM e MEDRANO, 1991b; ZSOLNAI E FEESUS, 1997; STEVANOVIC *et al.*, 2000).

Para o *locus* gênico da κ -caseína, o leite da variante B é associado à maiores concentrações de gordura, proteína e κ -caseína do que a variante A. Além disso, a estabilidade das micelas de caseína e desnaturação pelo calor da β -lactoglobulina, e as propriedades de coagulação e firmeza de coágulo, características importantes para a fabricação de queijos, são fatores fortemente influenciados pelo polimorfismo destas proteínas (BOTARO, 2007).

O uso de leite de vacas com genótipo BB para κ -caseína resultou em menor tempo de coagulação para o preparo de queijo, formação de coágulo com maior densidade devido ao menor tamanho da micela, assim como uma maior produção de queijo, devido a maiores teores de caseína em relação à proteína total, quando

comparado ao leite de vacas com genótipo AA para κ -caseína (VAN EENENNAAM e MEDRANO, 1991a; VAN EENENNAAM e MEDRANO, 1991b).

Portanto, o alelo B exerce grande influência na qualidade do leite, e desta maneira, podem-se identificar bois homozigotos, ou seja, que têm o alelo B duplo; todas as vacas filhas deste boi terão pelo menos uma cópia deste alelo, assim se melhorará a qualidade do leite e se terá mais eficiência na transformação do leite em queijo. É um processo de melhoramento genético rápido entre uma geração e outra, aumentando de forma importante a frequência do alelo B (MUÑOZ e ALVAREZ, 2009).

Também pode-se ressaltar que o aumento da produção de queijo pela modificação da proteína láctea pode ser alcançado mais rapidamente através da seleção de vacas com os genótipos BB para κ -caseína assim como BB para β -lactoglobulina (BOBE *et al.*, 2004). O que favorece a produção de queijos em termos de qualidade quando comparada ao leite proveniente de animais com a variante A (NG-KWAI-HANG *et al.*, 2002).

Desta forma, o alelo B é associado com melhores características para processamento industrial do leite (MACKLE *et al.*, 1999), uma vez que o genótipo BB para caseína é considerado melhor para a produção de queijo por elevar os teores de caseína do leite, aumento este observado da ordem de 23% (LIMA, 2005). O queijo produzido com leite de vacas com genótipo BB é 10% maior em produção, apresentando rendimento 12% maior em queijos tipo muçarela e 8% em queijo tipo cheddar em relação ao leite de vacas com genótipo AA (VERONEZI, 2017).

b) β -caseína

A β -caseína é a segunda proteína mais abundante no leite de vaca, constituindo até 45% das caseínas totais e contém 209 aminoácidos, e o gene que codifica para esta proteína está localizado no cromossomo 6 (SULIMOVA *et al.*, 2007). Estima-se que existam 13 variantes genéticas descritas (A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G) (RAHIMI *et al.*, 2015). Nas raças de gado leiteiro as variantes mais comuns de β -caseína são A1 e A2. Sendo que o alelo A1 tem uma mutação que causa uma substituição na β -caseína na posição 67 da cadeia de nucleotídeos,

na qual a prolina no A2 é substituída por uma histidina no A1 (VERCESI FILHO, 2012), conforme Figura 1.



Figura 1: Polimorfismo do aminoácido 67 nas variantes A1 e A2 da β-caseína. Fonte: USPRP, 2016.

A digestão da β-caseína A1 no trato gastrointestinal humano produz β-casomorfina7 (BCM-7), que tem como um de seus produtos finais da hidrólise enzimática de proteínas um peptídeo bioativo como morfina (STEWART *et al.*, 1987; DAMIANE *et al.*, 1992; LIEN *et al.*, 1992; SHARMA *et al.*, 2013), cuja atividade poderá desempenhar um papel no desenvolvimento de algumas doenças humanas (RAHIMI *et.al.*, 2015), tais como problemas coronarianos (MC LACHIAN, 2001), alergias (GOBBETTI *et al.*, 2002) e *diabetes mellitus* tipo 1 (ELLIOT *et al.*, 1999), entre outros. Ou seja, a proteína proveniente do alelo A1 aumenta as chances de diabetes, doenças do coração e, ainda, de autismo em pessoas com pré-disposição (VERCESI FILHO *et.al.*, 2012).

Em contrapartida, a presença de histidina em vez de prolina na variante A2 evita a hidrólise da ligação peptídica entre os resíduos 66 β-caseína A2, não ocorrendo a produção de BCM-7 (SHARMA *et al.*, 2013).

Considerando que a β-caseína do tipo A1 está relacionada a processos alérgicos e intolerância alimentar, doenças coronarianas, entre outras, além de, não ser adequada ao processo de fabricação de queijos nobres, recomenda-se a identificação prévia e/ou a seleção precoce de reprodutores com genótipos A2, a fim de agregar valor nutricional ao leite, reduzir a possibilidade de doenças associados ao consumo deste alimento e também beneficiar financeiramente os criadores (LIMA e LARA, 2015).

3.2.2 β -lactoglobulina

A β -lactoglobulina é o peptídeo mais abundante do soro (45% a 57%), representando, no leite bovino, cerca de 3,2 g L⁻¹. Apresenta médio peso molecular (18,4 a 36,8 kDa), o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado. É o peptídeo que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada, com cerca de 25,1%, sendo também importante carreador de retinol (pró vitamina A) materno para o filhote (De WIT, 1998). A β -lactoglobulina consiste de uma sequência de 162 resíduos de aminoácidos (HAMBLING *et al.*, 1992), sendo primeiramente sequenciada por Braunitzer *et al.* (1972), e completamente genotipada por Alexander *et al.* (1993).

A β -lactoglobulina, assim como as caseínas, também possui os alelos A e B. Foi demonstrado que o leite de ambos os genótipos contém maiores concentrações de proteína total e β -lactoglobulina, porém menores de caseína e gordura. Ao contrário do genótipo BB que produz mais gordura e caseína (BOTARO, 2007). De acordo com Ng-Kwai-Hang (1998), a estabilidade das micelas de caseína e a estabilidade térmica da β -lactoglobulina são influenciadas pelo polimorfismo genético dessas proteínas.

O genótipo B para β -lactoglobulina está associado com melhores propriedades de coagulação, como firmeza e tempo de formação do coágulo. Na fabricação de queijos, por exemplo, é preferível a utilização de leite proveniente de animais com genótipo B para β -lactoglobulina, já que a produção de queijos será favorecida em termos de qualidade quando comparada ao leite proveniente de animais com a variante A (NG-KWAI-HANG *et al.*, 2002).

Bobe *et al.* (1999) verificaram que o leite de vacas do genótipo BB de β -lactoglobulina apresentou maior rendimento na produção de queijos e estava associada a maiores concentrações de ácidos graxos de cadeia curta, os quais têm maiores implicações na textura e caracterização sensorial de produtos lácteos. Enquanto o alelo A está associado a ácidos graxos de cadeias longas (18:0 e 18:1),

os quais apresentam menor contribuição na produção de queijos (BOBE *et al.*, 2004).

Em revisão acerca da associação entre os diferentes genótipos das proteínas do leite e a capacidade de produção de queijos, Lawrence (1997) relatou uma correlação positiva entre as concentrações de caseína total e gordura, e a diminuição de frequência de aparição do alelo A para β -lactoglobulina. Hill *et al.* (1997) relatam que o rendimento em base seca foi 6% maior nos queijos produzidos a partir de leites com genótipo BB em comparação aos de genótipo AA e 3% maior do que os fabricados a partir de leite de tanque, ou seja, leite de procedência genética desconhecida. Vacas com genótipo BB produzem leite com maior quantidade de caseína, contribuindo para seu melhor aproveitamento quando do processamento (HILL, 1993).

3.3 Processos laboratoriais de Genotipagem

3.3.1 Extração de DNA

Estudos básicos sobre técnicas de extração de DNA são de extrema importância para o sucesso de trabalhos científicos no campo da biologia molecular. A extração de material genético puro e de boa qualidade é pré-requisito para qualquer análise molecular (MARENGONI *et al.*, 2006). A extração do DNA tem sido realizada em diferentes tecidos de animais como sangue, sêmen e pelos de touros de diferentes raças zebuínas (COELHO *et al.*, 2004).

Um protocolo de extração de DNA, utilizado para este tipo de material consiste na técnica de Fenol - Clorofórmio - Álcool isoamílico, adaptado das técnicas de Sambrook e Russel (2001).

Para extração de DNA de sêmen bovino, o processo tem início com o descongelamento do material coletado. Enquanto para a obtenção do DNA genômico de sangue, inicialmente tem-se a etapa de transferência de DNA, onde o sangue é centrifugado e após se dividir em três fases (plasma, leucócitos e

hemácias), conforme ilustrado na Figura 2, a parte leucocitária será utilizada no protocolo de extração. Para as demais etapas de extração de DNA genômico, ambas as amostras seguem o mesmo protocolo, constituído por três etapas subsequentes, a saber, lise celular, purificação e precipitação do DNA.



Figura 2: Separação das frações do sangue bovino (plasma, leucócitos e hemácias) após centrifugação. Fonte: MD SAÚDE, 2015.

A primeira etapa do processo consiste na lise das membranas celulares geralmente utilizando método químico com detergente (SDS) e EDTA, associado a método enzimático, utilizando a Proteinase K. Na segunda etapa do processo, é feita a purificação do DNA, na qual são utilizados solventes orgânicos, tais como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico para desnaturação de contaminantes proteicos e lavagem de lipídeos. Finalmente, na terceira etapa, ocorre a precipitação do DNA a fim de aumentar sua concentração e pureza, nesta fase normalmente é utilizado acetato de sódio e isopropanol gelado (-20°C) (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A figura 3 mostra a obtenção do DNA após estas etapas.

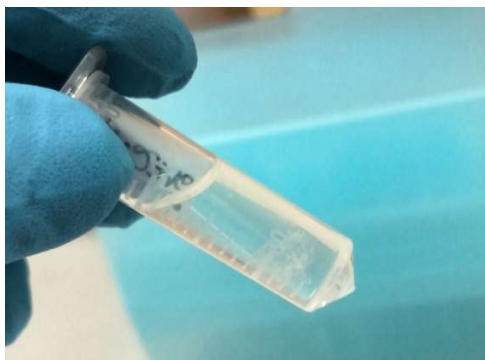


Figura 3: Pellet de DNA após precipitação a partir de um protocolo de extração de DNA de sangue bovino. Fonte: O Autor, 2017.

O processo de quantificação é realizado após a extração do DNA genômico, no qual as amostras são analisadas quanto a sua qualidade, a qual é dada pelos parâmetros razão de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm. A absorbância máxima do DNA é a 260 nm, as proteínas apresentam um pico de absorbância a 280 nm e demais contaminantes em torno de 230 nm. Desta forma, a razão de absorbância 260/280 nm é frequentemente utilizada para avaliar a contaminação por proteínas, sendo o valor de referência (amostra livre de proteínas) entre 1,8 e 2,0. Enquanto a razão 260/230 nm é utilizada para avaliar a contaminação por outros compostos (como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol), sendo o valor de referência igual ou superior a 2,0. Além disso, por esta mesma técnica é possível obter a concentração de DNA obtida, uma vez que o valor de absorbância igual a 1 é equivalente a uma concentração de 50 µg de DNA por mL de solução (BROWN, 2003).

3.3.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica amplamente empregada em estudos moleculares, em virtude da relativa facilidade de amplificar *in vitro* regiões específicas do genoma de qualquer organismo. A PCR possibilita a amplificação de sequências de DNA presentes em misturas complexas

e permite estudos de natureza variada, tais como desenvolvimento de métodos de diagnósticos altamente sensíveis e específicos, obtenção de grandes quantidades de DNA para sequenciamento e análises sobre a diversidade genética de populações (OLIVEIRA *et al.*, 2007). A técnica permite a amplificação do material genético em algumas horas, permitindo uma detecção segura e razoavelmente rápida de marcadores moleculares associados a doenças genéticas, por exemplo de alelos específicos (KOCHAN *et al.*, 2008).

De acordo com Barroso *et al.* (1998) e Olenaki (2010), para κ -caseína e para β -lactoglobulina, utiliza-se a técnica da PCR convencional, seguida da análise do perfil de restrição dos *amplicons* obtidos e para β -caseína, utiliza-se a PCR em tempo real.

a) PCR convencional e análise dos padrões de restrição

Para a realização da técnica de PCR é necessário o DNA molde; a enzima DNA polimerase; iniciadores da reação (*primers*); desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's); tampão adequado para a DNA polimerase utilizada; cátion bivalente – Mg^{2+} , como cofator da enzima (CHEN e JANES, 2002; ROCHE, 2003; PELT-VERKUIL *et al.*, 2008). Posteriormente, as amostras são levadas a um termociclador, o qual promoverá a ciclagem de temperatura necessária para as etapas de desnaturação do DNA molde, anelamento dos iniciadores e polimerização do DNA. Ao final deste procedimento, as amostras são testadas em gel de eletroforese para comprovar se ocorreu amplificação (BROWN, 2003).

Dessa foram, utilizam-se primers alelo-específicos para amplificar as regiões gênicas de interesse. O resultado desta técnica, por exemplo, para os genes que codificam para a β -lactoglobulina é mostrado na figura 4, nesta figura as bandas do primeiro poço representam o marcador de peso molecular e os demais poços apresentam as bandas de amplificação para um fragmento do referido gene, com 247 pares de bases.



Figura 4: Gel de agarose após revelação de PCR para β -lactoglobulina. Fonte: O Autor, 2017.

Logo após confirmar a amplificação das reações de PCR convencional, devem ser realizados ensaios de digestão com enzimas de restrição, sendo estas enzimas específicas para cada tipo de gene que se deseja clivar. Ao final da digestão, as amostras são testadas em gel de eletroforese para genotipar os animais em estudo, uma vez que para cada genótipo há um perfil de restrição distinto (LODISH, 1999), como mostrado nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Padrão de restrição esperado dos fragmentos digeridos para os alelos de β -lactoglobulina com a enzima *HaeIII*.

Genótipos	Tamanho dos fragmentos em pares de bases		
AA	--	99	148
BB	74	99	--
AB	74	99	148

FONTE: EMBRAPA, 2013

Tabela 2 – Padrão de restrição esperado dos fragmentos digeridos para os alelos de κ -caseína com a enzima *Hinfl*.

Genótipos	Tamanho dos fragmentos em pares de bases			
AA	--	326	100	27
BB	426	326	100	27
AB	426	--	--	27

FONTE: EMBRAPA, 2013

A Figura 5 mostra um resultado típico para estas digestões, revelado em gel de poliacrilamida. Nesta imagem é exemplificado a digestão do *amplicom* para β -lactoglobulina, mostrado na Figura 3.4. Como apresentado na Tabela 3.1 as

possíveis bandas para a genotipagem desse gel são: 74, 99 e 148 pares de base (pb). Sendo que o genótipo AA apresenta os fragmentos de 99 e 148 pb. O genótipo BB possui os fragmentos de 74 e 99 pb. Enquanto o genótipo AB apresenta todos os fragmentos, ou seja, 74, 99 e 148 pb. Sendo que o genótipo que não possui identificação clara ou apresenta alguma falha é representado pela denominação FF, e deverá ser feita novamente genotipagem para o mesmo.

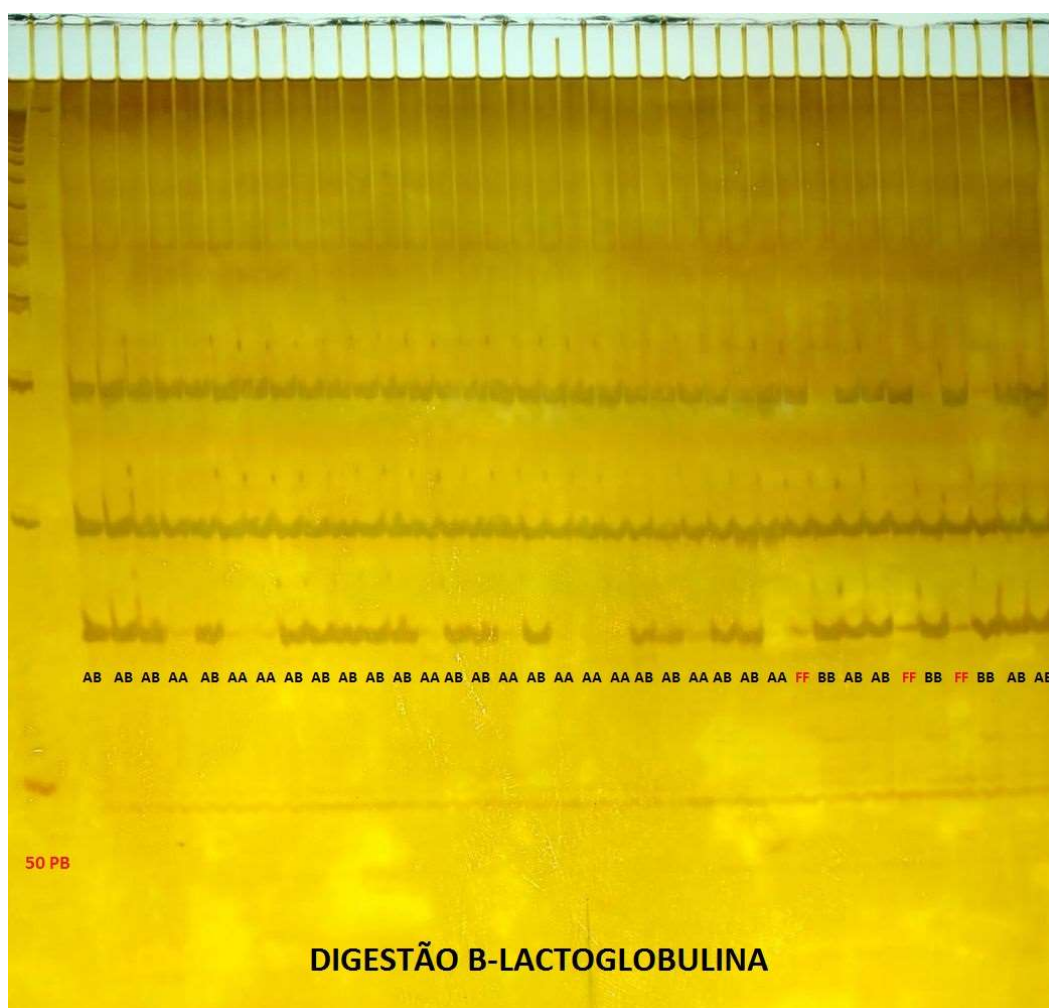


Figura 5: Gel de Poliacrilamida após revelação de digestão dos amplicons para os alelos de β -lactoglobulina com a enzima HaeIII, conforme tabela 3.1. Fonte: O Autor, 2017.

b) PCR em Tempo Real

Para a amplificação do gene da β -caseína é utilizada a técnica da PCR em Tempo Real, neste caso há um primer para cada alelo da proteína, sendo os *primers*

forward para o alelo A1 (IGBhF 5' CTT CCC TGG GCC CAT CCA 3') e para o alelo A2 (IGBpF 5' CTT CCC TGG GCC CAT CCC 3') e um *primer reverse* comum para ambos os alelos (IGBR 5' AGA CTG GAG CAG AGG CAG AG 3') para amplificar um fragmento de 244 pb do gene β -caseína (GANGULY *et al.*, 2013). Ou seja, são realizadas duas reações de PCR para cada animal, sendo uma com o *primer* referente ao alelo A1 (IGBhF) e outra com o *primer* referente ao alelo A2 (IGBpF).

No caso específico desta técnica, ao final da amplificação do DNA, são gerados valores de *Cycle Threshold* (Ct), o que representa o número de ciclos da PCR no qual o sinal de fluorescência (SYBR® Green) alcança o limiar da curva de amplificação. Desta forma, os resultados da PCR Tempo Real são baseados no *Cycle Threshold* (Ct), uma vez que Ct indica o número mínimo de ciclos para que a amplificação seja detectada pelo aparelho (BUSTIN, 2000).

Os ciclos iniciais de amplificação, caracterizados por reduzidos incrementos nos sinais de fluorescência, definem o limiar de detecção. A metodologia permite monitorar, em tempo real, o momento da reação em que a fluorescência emitida pelo produto amplificado ultrapassa o limiar de detecção (indicado por Ct). O ponto Ct indica o momento a partir do qual a reação é otimizada (fase exponencial) e o produto amplificado é quantificado (WEINMANN, 2009).

A quantificação do produto amplificado é realizada através de comparação com uma curva padrão que correlaciona a intensidade dos sinais de fluorescência, gerados durante os ciclos de amplificação, com as concentrações conhecidas de uma sequência idêntica à que se quer quantificar (WEINMANN, 2009).

Além disso, é necessário obter a curva de dissociação dos *primers*, também denominada curva de “*melting*”, deve-se ajustar o aparelho para iniciar a temperatura por volta dos 70°C e variar de grau em grau até no máximo 95°C. Este procedimento é realizado pelo aparelho após o ciclo de amplificação da PCR em tempo real. Neste processo pode ser determinado o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos primers de suas sequências-alvo. A inclusão da curva de dissociação é essencial para verificar se houve formação de um único produto ou se produtos inespecíficos também foram formados (PONCHEL *et al.*, 2003).

Após finalizar a reação de PCR no termociclador de tempo real, analisa-se as curvas formadas para genotipar cada amostra. Para o genótipo A1A1, os valores de Ct's devem ficar distantes, na reação com primer A1, próximo a 25 e na reação com primer A2, maior que 34, ou não detectável, podendo considerar ausência desse alelo. A curva de dissociação está presente com pico próximo a 83°C somente na reação com primer A1, conforme observado nas figuras 6 e 7.

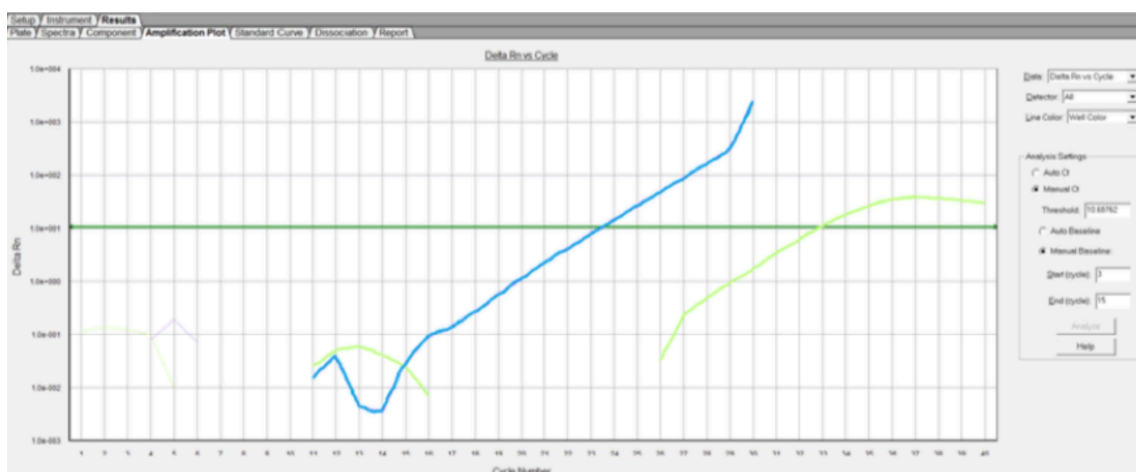


Figura 6: Análise da curva de amplificação para o genótipo A1A1 da β -caseína. Linha azul: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.

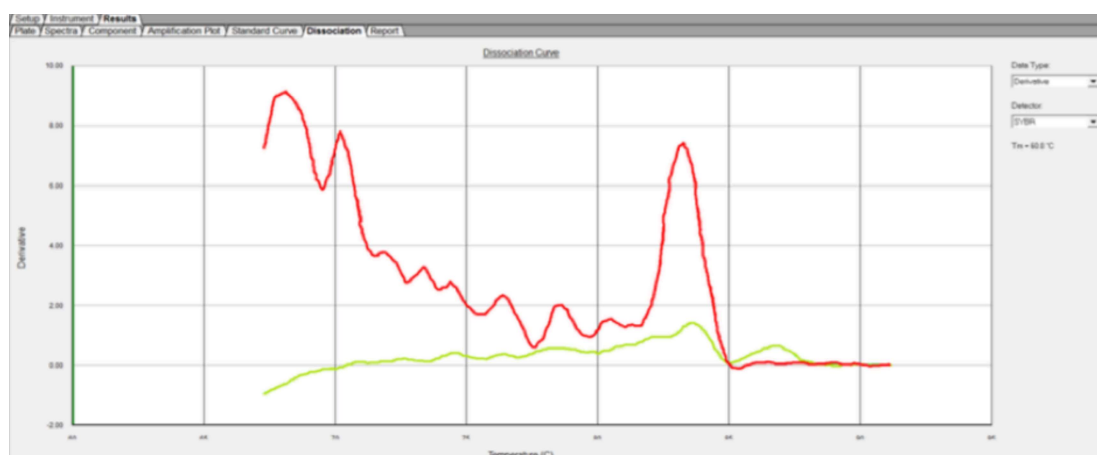


Figura 7: Análise da curva de Dissociação para o genótipo A1A1 da β -caseína. Linha vermelha: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.

Já para o genótipo A2A2, a reação com o primer A2 deve ter valores de Ct's próximas a 25 e a reação com primer A1 acima de 34, ou não detectável. A curva de dissociação só deve estar presente com pico em 83°C na reação com primer A2, como pode ser observado nas figuras 8 e 9.

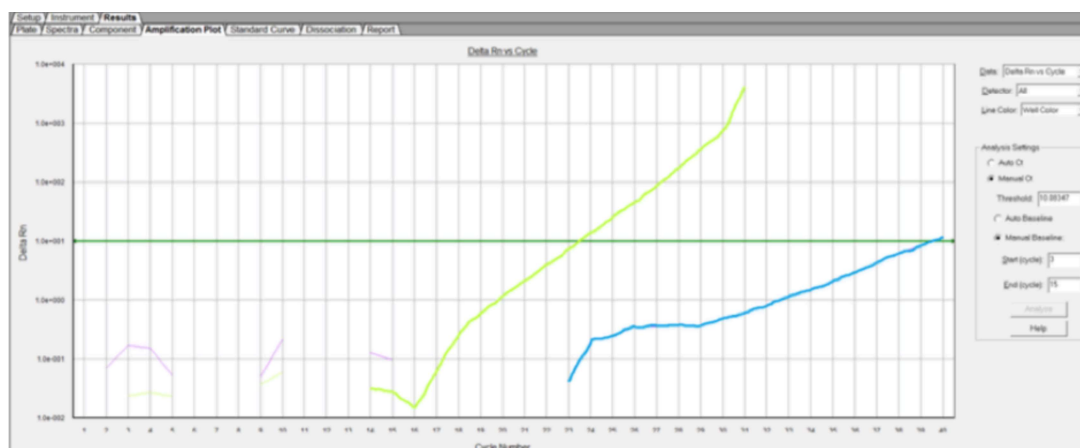


Figura 8: Análise da curva de amplificação para o genótipo A2A2 da β -caseína. Linha azul: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.

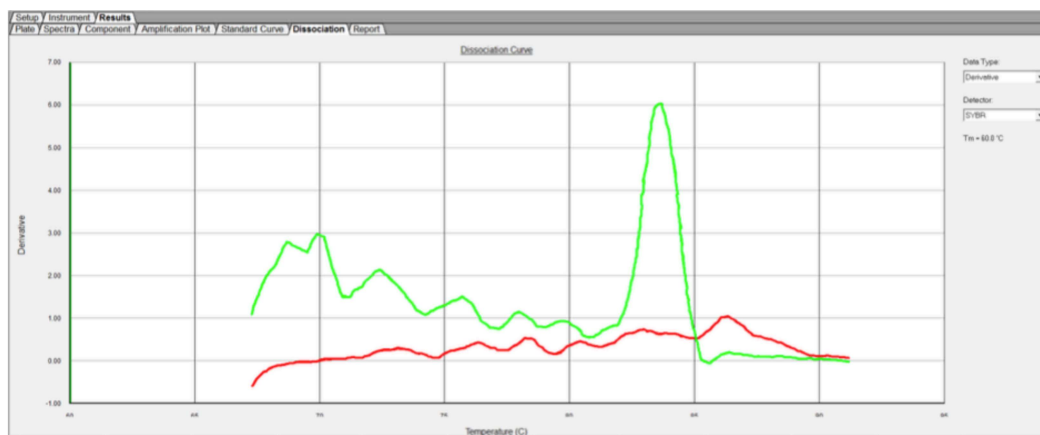


Figura 9: Análise da curva de Dissociação para o genótipo A2A2 da β -caseína. Linha vermelha: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.

Por fim, para o genótipo A1A2, o valor de Ct's nas reações com primer A1 e A2 devem ficar próximos um do outro, entre 23 e 25, sendo a diferença entre eles

em geral menor que 2. Enquanto a curva de dissociação deve apresentar os dois picos próximo a 83°C, tanto para a reação com primer A1 quanto para a reação com primer A2. Ou seja, em ambas as reações houve amplificação, logo os alelos A1 e A2 estão presentes, esses resultados são exemplificados nas figuras 10 e 11.

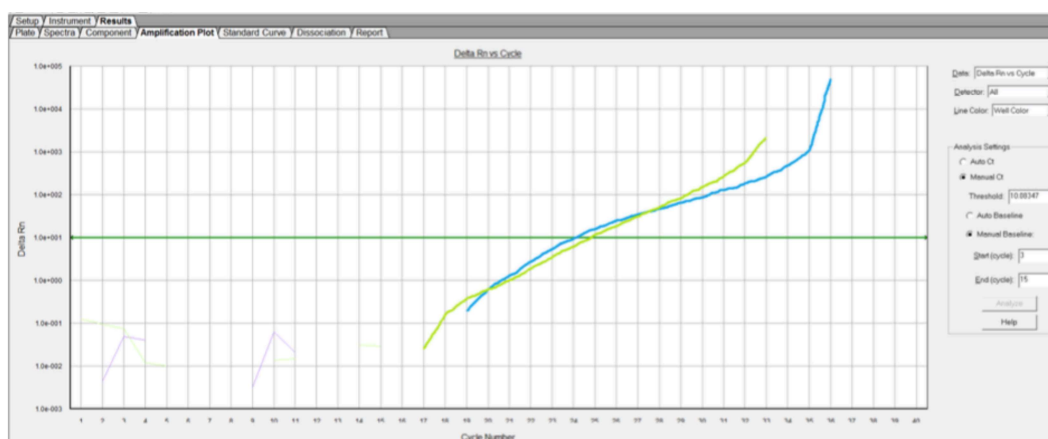


Figura 10: Análise da curva de amplificação para o genótipo A1A2 da β -caseína. Linha azul: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.

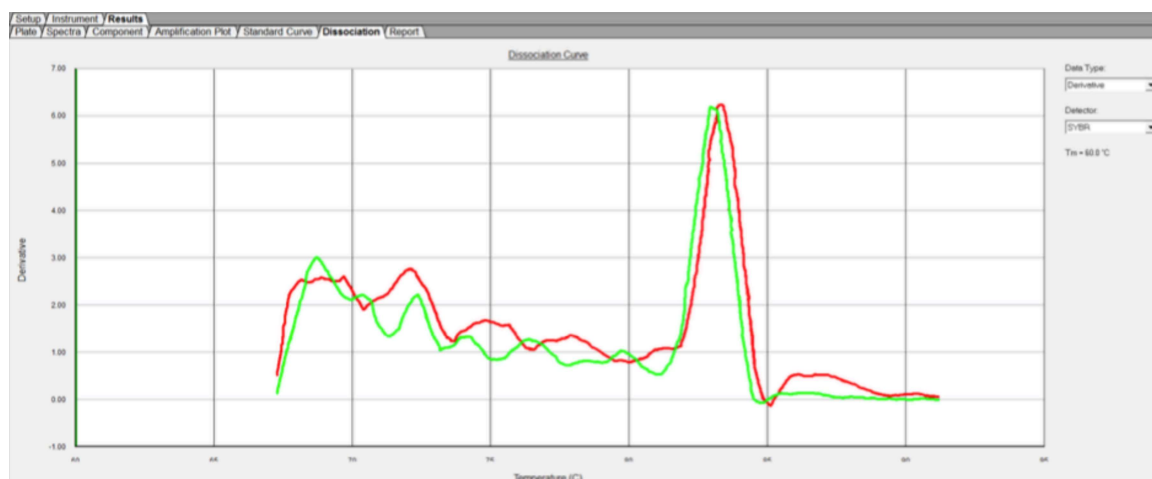


Figura 11: Análise da curva de Dissociação para o genótipo A1A2 da β -caseína. Linha vermelha: alelo A1; linha verde: alelo A2. FONTE: Protocolo PCR – Tempo Real β -caseína, Embrapa Gado de Leite.

3.4 Impacto Econômico da Genotipagem das Proteínas do Leite

Devido à importância comercial, as proteínas do leite têm sido estudadas extensivamente e são provavelmente uma das melhores fontes de proteína alimentar. Além disso, a fabricação de queijos, iogurtes, leite em pó, entre outros, depende de algumas propriedades únicas das proteínas do leite, o que justifica maior investimento em pesquisas nesta área (FOS e MCSWEENEY, 2003).

Mudanças na composição do leite podem alterar o seu valor como matéria-prima para fabricação de derivados. Por exemplo, a diminuição de 0,5% de sólidos totais ou 0,1% em proteínas pode significar perda de até 5 toneladas de leite em pó ou 1 tonelada de queijo, respectivamente, para cada milhão de litros de leite processados (SANTOS e FONSECA, 2007).

Atualmente programas de melhoramento genético estão sendo implementados e custeados pelas próprias empresas e centrais de pesquisas da área, a qual remunera o pecuarista que aderir adequadamente ao programa. Como exemplo, pode-se citar o manual de como são feitos os testes de progênie (provas de touros) na Alta Genetics (empresa internacional com sede brasileira em Uberaba-MG), no qual SANTOS e CORRÊA (2002) afirmam que as centrais pagam por cada touro em avaliação. Bem como a Holstein Association realiza a avaliação de filhas através do incentivo fornecido ao criador referente às duas primeiras filhas de cada touro jovem avaliadas, sendo a oferta ao pecuarista filiado ao programa de US\$25,00 por cada uma (SANTOS e CORRÊA, 2002).

O leite *in natura* fornece, em média, de 3 g a 3,5 g de proteínas por 100 g de leite. De acordo com a legislação nacional com a Instrução Normativa 51 (IN51) do Ministério da Agricultura, o teor mínimo de proteína deve ser 2,9% para que o leite seja passível de comercialização entre produtor e indústria (MAPA, 2002). Logo, a partir de uma fiscalização mais rigorosa da qualidade do leite, por meio de análises laboratoriais sistemáticas, é possível que a qualidade do leite passe a ser melhor e mais valorizada no Brasil. A partir desta normativa, os teores de gordura e de proteína do leite devem atender a padrões mínimos. Isto porque sem a composição mínima, o rendimento industrial de produtos lácteos fica comprometido, acarretando

prejuízos na cadeia agroindustrial. Sob este contexto, o produtor, por sua vez, pode ser penalizado pela indústria, quando esta atribuir remuneração associada à qualidade do leite (BRASIL, 2002).

Todavia, sabe-se que os preços e os custos dos componentes do leite deveriam determinar o seu valor econômico, o qual é necessário para a elaboração de índices de seleção, para combinar os componentes de forma a maximizar o ganho genético e econômico (WELLER, 1994).

Em torno de três décadas atrás, o mercado internacional focava em produção de leite, buscando maior quantidade em libras. No entanto, está ocorrendo uma inversão de valores, onde a qualidade do leite passou a ser primordial no setor, principalmente no que diz respeito a proteína e gordura (MIGLIOR *et al.*, 2005). O setor brasileiro ainda não se adequou a tal mudança, visto que ainda se paga mais por veículos (leite sem gordura e sem proteína) do que por qualidade (MADALENA, 1999).

Um fator que favorece esse cenário brasileiro deve em parte pela escassez e limitações dos programas de avaliação genética para bovinos leiteiros. Adiciona-se que a maior parte do leite comercializado é processada por laticínios, sendo estes, e não o consumidor, os que diretamente determinam a valorização das características do leite, através do que por elas pagam aos produtores (MADALENA, 2012).

Logo, fica claro que no Brasil não existe uma política bem estabelecida de pagamento diferenciado pela qualidade do leite, e sim padrões mínimos a serem atendidos tanto em relação à composição, quanto aos aspectos de sanidade que, caso não sejam atendidos, ocasionam penalizações no valor pago ao produtor (CARDOSO *et al.*, 2004).

A não bonificação pela proteína e gordura no leite implica em remunerar estes produtos ao mesmo preço que o veículo, sendo que os requerimentos nutricionais dos animais, para se produzir os dois primeiros componentes são muito maiores. A energia necessária para se produzir um kg de gordura é 56 vezes maior que para um kg de água, lactose e minerais, e a de um kg de proteína 28 vezes maior, de forma que, em não havendo o pagamento adequado, é antieconômico

para o produtor produzir gordura e proteína, sendo preferível, pelo contrário, produzir leite o mais aguado possível (MADALENA, 2000).

4 METODOLOGIA

Inicialmente, foi feito um levantamento na literatura por meio de artigos, reportagens, teses, livros e sites a respeito da genotipagem das proteínas do leite, nos quais foram levantadas as técnicas utilizadas, a demanda por tal serviço, a importância, as vantagens e as perspectivas sobre esta técnica e suas aplicações.

Foram selecionadas cinco principais empresas brasileiras de genotipagem animal via ligações telefônicas e e-mails, onde os profissionais da área foram indagados com algumas perguntas, as quais estão presentes no formulário abaixo:

Formulário sobre Melhoramento Genético Leiteiro

1. Sua empresa faz genotipagem para as proteínas do leite (β -caseína, κ -caseína e β -lactoglobulina)?
2. Qual o custo envolvido na genotipagem das proteínas do leite?
3. Qual a demanda por tais pesquisas?
4. Qual a vantagem do melhoramento genético do gado de leite em relação a geração de valor para o produtor?
5. Quais são os gargalos brasileiros frente a essa linha de pesquisa? Quais ações podem ser feitas para reverter essa situação?
6. Você considera viável economicamente a genotipagem para as proteínas do leite? Quais as perspectivas que você vê para esse mercado?

As perguntas foram discursivas com o objetivo de obter mais insumos e visões em relação ao cenário brasileiro do melhoramento genético para gado de leite. Neste formulário também foi solicitado permissão para divulgação do nome da empresa.

Com o objetivo de entender os produtores de gado leiteiro também foi realizado um outro formulário focado neste público alvo:

Formulário sobre Produtor de Gado Leiteiro:

1. Você conhece melhoramento genético?

2. Você utiliza ou já utilizou melhoramento genético em seu gado leiteiro?
3. Se sim, você notou melhoria em sua produção?
4. Se não, você tem interesse em utilizar?
5. Em termos financeiros como o melhoramento genético contribuiu para melhorar sua produção?
6. O que você acha que deve melhorar para que esse método tenha maior aceitação no Brasil?

Por fim, as respostas obtidas foram analisadas e discutidas com base nos levantamentos obtidos na literatura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio de pesquisas telefônicas, sites e e-mails das empresas fornecedoras dos serviços de genotipagem, foi possível entender melhor o cenário brasileiro em relação a demanda por genotipagem de proteínas do leite. É importante ressaltar que algumas empresas autorizaram a publicação das respostas ao questionário, mas não autorizaram a publicação de seus nomes, por esse motivo, algumas respostas estarão entre aspas, mas sem a identificação da empresa que as gerou. As respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Respostas coletadas através da pesquisa realizada com as empresas de genotipagem bovina.

Empresas	Proteína Genotipada	Preço por amostra	Demanda	Vantagem	Gargalo
A*	β -caseína	Não fornecido	Tende a crescer.	Valor agregado ao produto final.	A entrega da matéria-prima.
B*	β -caseína	Não fornecido	Tende a crescer.	Valor agregado ao produto final.	Falta de conhecimento de toda a cadeia produtiva.
Gene Genealógica	β -caseína	R\$ 34,00 a R\$ 38,00	Não respondido	Não respondido	Não respondido
C*	β -caseína, β -lactoglobulina, k-caseína	Não fornecido	Já está crescendo.	Valor agregado ao produto final.	Falta de bonificação pela matéria-prima de qualidade.

*As empresas não autorizaram suas identificações.

Das empresas da área de genética bovina contatadas, 100% realizam genotipagem para β -caseína buscando a seleção para o alelo A2, uma vez que o alelo A1 está relacionado a processos alérgicos, intolerância alimentar e doenças como diabetes *mellitus*, doenças do coração, doença coronariana, entre outras. O preço da genotipagem dessa proteína varia de acordo com a quantidade de

amostras que são enviadas, em uma faixa de R\$34,00 a R\$38,00, por amostra, no laboratório Gene Genealógica – Central de Genotipagem de Animais, localizado em Belo Horizonte-MG (<http://www.genegenealogica.com.br/>). Enquanto apenas 25% dessas empresas realizam a genotipagem para β -lactoglobulina e κ -caseína.

Essas pesquisas começaram a ter um mercado satisfatório devido a um aumento de demanda a nível nacional. Tal fato pode ser comprovado pelas respostas obtidas das empresas entrevistadas, em que todas elas ressaltam um mercado promissor. Inclusive uma delas afirmou que “Nos últimos anos a demanda por animais homozigotos para estas características e pelo leite de melhor rendimento e menos alergênico está aumentando, com isso a procura e as pesquisas são cada vez mais comuns”.

Desta forma, nota-se que a demanda por seleção de β -caseína já apresenta um mercado mais consolidado do que as demais proteínas, visto que ela está diretamente relacionada a derivados de leite menos alergênicos, o que atinge um mercado de 40% da população brasileira (LEAL e CRISTALDO, 2013).

A vantagem do melhoramento genético do gado de leite se dá principalmente ao valor agregado ao produto final e seus derivados, foi mencionado em uma das entrevistas que “Com certeza toda e qualquer evolução genética tem por finalidade uma maior agregação de valor ao produto. O produto que os bovinos nos dão são nossa renda e se aumentarmos a renda, melhor para todos. Isso vale para produtos diferenciais e também para maior quantidade produzida”.

O cenário ideal com a inserção do melhoramento genético é visto de modo que “O produtor entrega um leite de maior qualidade ao laticínio, que por sua vez o bonifica, para quem beneficia o próprio leite também, consegue um maior rendimento e aproveitamento do leite, produzindo mais derivados por litro de leite, ou então atinge um nicho de mercado que paga a mais pela diferenciação do produto”.

Grandes produtores brasileiros, que visam exportações de leite, têm que se adequar às exigências internacionais, pois no cenário global, há uma demanda maior em relação à qualidade do leite (MOURÃO *et al.*, 2012). Por exemplo, pode-se citar a forte linha de pesquisa nos países como Nova Zelândia, Itália e Holanda,

que estudam a coagulação do leite, visto que o foco está na produção de leite para fabricação de derivados, especialmente queijos.

A composição da proteína do leite determina o valor nutricional e as propriedades tecnológicas do leite. A produção de queijo, por exemplo, é aumentada com o acréscimo da concentração de caseína, e propriedades do queijo, como tempo de coagulação do leite e a consistência da coalhada, que dependem da composição da caseína (WEDHOLM *et al.*, 2006). Por exemplo, 100 litros de leite com 12,5% de sólidos totais, renderão 10 kg de queijo. Se os mesmos 100 litros tiverem 10% de sólidos totais, o rendimento será de 8 kg de queijo. O leite produzido no Brasil possui em torno de 12,5% de sólidos totais, que precisa ser aumentado para sermos mais competitivos no mercado internacional e para agregar valor ao leite produzido no país (RUBEZ, 2004).

Desta forma, acredita-se que a perspectiva seja uma tendência de inserção da genética molecular na qualidade do leite, mas para isso é necessário que o setor comece a bonificar o produtor que atenda esta demanda, bem como afirma uma outra empresa entrevistada: “Precisamos investir em uma política de bonificação realmente eficiente aos produtores, que remunera mais por qualidade do que pelo volume produzido, isso vai exigir e incentivar cada vez mais os produtores a investir em manejo e animais superiores para atender as demandas do mercado”.

Conforme complementa Bruno Scarpa Nilo, gerente de produção de leite da CRI Genética “Muito ainda se tem por fazer. Eu diria que o principal gargalo é a dificuldade de coleta de dados reais, a variabilidade de sistemas, as diferentes raças trabalhadas e a falta de incentivo”.

A qualidade do leite está diretamente relacionada à saúde, alimentação e manejo dos animais, com a qualificação da mão-de-obra, higiene dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha, bem como o transporte adequado até a indústria. Tais fatores influenciam a sua composição original e, conseqüentemente, as características de sabor, cor, cheiro e viscosidade (PINNA e LIZIEIRE, 2000).

Tais empresas também ressaltaram que o resultado da inserção do melhoramento genético na qualidade do leite é atingido a longo prazo, daí a importância de o produtor aderir a esse novo sistema, para quando o mercado

colocar essa exigência em vigor, que ele já esteja produzindo com melhor qualidade, como afirma uma das empresas entrevistadas: “É uma tendência de mercado, por mais que estejamos apenas no início precisamos investir na identificação destes animais, tendo em vista o intervalo de gerações da bovinocultura leiteira. A tendência é realmente o pagamento por qualidade e exigência de um produto que tenha melhor rendimento ou que possa ser consumido por um grupo específico de pessoas, mas para que daqui alguns anos o produtor tenha este produto disponível ele precisa iniciar os investimentos na genética agora, pois não é uma resposta a curto prazo, os animais precisam nascer, crescer, e depois produzir leite, o que na melhor das hipóteses demora pelo menos 2 anos, com isso, o produtor ou a empresa que se preocupar em buscar estes animais quando isto for uma exigência do mercado vai precisar de um longo período até começar a colher os resultados”.

A remuneração de cada componente do leite para o produtor é obtida de acordo com a diferença entre o valor pago pelo seu produto e o custo que ele teve para a sua produção. No Brasil, apenas a Cooperativa Castrolanda e alguns laticínios do Paraná bonificam adequadamente a proteína e a gordura, sendo que os demais locais do Brasil de modo geral não remuneram pela proteína e a gordura, ou seja, paga-se pelo veículo, pelo volume de leite produzido, primordialmente água e açúcar (MOURÃO *et al.*, 2012)

Em termos quantitativos, Cardoso *et al.* (2004) identificaram valores econômicos de US\$ 0,15; -US\$ 0,48 e -US\$ 0,31 por kg de leite para veículo (leite sem gordura e sem proteína), gordura e proteína, respectivamente. A partir desses dados é inviável para o produtor investir em qualidade nutricional do leite, visto que isso reduziria o lucro da fazenda. Conclui-se, portanto, que o valor dispensado para a produção de melhor qualidade do leite torna-se mais elevado que o do veículo, fazendo com que essa seleção seja antieconômica (MARTINS *et al.*, 2003). Além de Cardoso *et al.* (2004), Martins *et al.* (2003), Bueno *et al.* (2004) e Seno *et al.* (2007) também encontraram valores negativos para proteína e gordura do leite, caso não haja maior valorização da remuneração para tais componentes.

O mesmo cenário foi mencionado por produtor de gado de leite, consultado neste trabalho, o qual afirma que ainda se paga no Brasil por quantidade em libras de leite e não por qualidade. Além disso, também foi levantado o gargalo de que as fazendas precisam atender quatro quesitos antes de incorporar a genética em seu rebanho. Sendo eles: nutrição, conforto para o gado, pasto e sanidade dos animais, após garantidas essas condições favoráveis é indicado acrescentar o melhoramento genético ao rebanho leiteiro.

Em suma, o melhoramento das características de reprodução deve ter prioridade, juntamente ao uso de boas técnicas de manejo reprodutivo, de nutrição e de sanidade, pois o desempenho reprodutivo terá influência sobre o andamento do melhoramento para as características de produção (AGRON, 2016).

Como o setor leiteiro no Brasil é dotado principalmente por micro ou pequenas propriedades rurais, cerca de 92% (FILHO e FONTES, 2009), o sistema ainda é, de modo geral, arcaico e não possui tanto investimento para acompanhar as melhorias propostas no setor, como a inserção da genética como fator crucial para obter melhores rendimento e produtividade.

Outro fator crucial, observado neste trabalho, é a falta de conhecimento da importância da genotipagem das proteínas do leite, tanto por parte da sociedade que irá se beneficiar em termos nutricionais e de saúde, quanto para os laticínios, pois os sólidos do leite influenciam no maior rendimento de derivados por litro de leite.

As tendências em produtividade e lucro da fazenda leiteira são uma combinação das mudanças em manejo, por exemplo, o nutricional, e as condições de saúde, além de adequação genética do rebanho. A tendência em produção de proteína do gado leiteiro dos EUA nos últimos anos revela que o ganho em mérito genético para produção de proteína é a metade do índice de ganho em produção de proteína (MOURÃO e ZAMPAR, 2008).

O Brasil tem enorme destaque como produtor de leite, figurando entre os cinco maiores do mundo. Apresenta mais que o dobro da produção da Argentina e o equivalente à soma das produções da Austrália e da Nova Zelândia, todos países tradicionalmente produtores e que de certa forma poderiam ameaçar nosso

mercado interno. Entretanto, em 2000, o produtor brasileiro recebeu em média US\$ 0,11 por litro comercializado, preço inferior ao praticado em qualquer desses países, reduzindo assim o risco de inundação de produtos importados (NOGUEIRA, 2001).

Há que se observar a falta de especialização tanto de rebanho como dos produtores brasileiros. A exploração de animais com produção anual em 2000 inferior a 1.000 litros, a ausência de cuidados sanitários e com a alimentação do plantel e a total falta de controle econômico da atividade, podem ser citados como alguns dos inúmeros problemas técnico-econômicos do setor (NOGUEIRA, 2001).

Portanto, a adoção de um plano próprio de melhoria da qualidade do leite, em sintonia com o plano governamental é apontada como uma das melhores saídas para o setor leiteiro brasileiro. Sendo fundamental a discussão aberta dos diversos setores da cadeia produtiva do leite, visando estabelecer objetivos harmônicos e efetivos, para a produção de componentes do leite, para a seleção com vistas às tendências e necessidades do mercado (MOURÃO *et al.*, 2012).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos gargalos podem ser levantados referente a baixa tendência atual em relação a genotipagem das proteínas do leite. Dentre eles a falta de conhecimento por parte do produtor pode ser um fator crucial. Além disso, acredita-se que os laticínios, responsáveis diretos pela compra do leite, também não detenham esse conhecimento, visto que ainda não há programas de remuneração do leite pelo teor de proteínas e gorduras, o produtor é remunerado pelos laticínios apenas por volume fornecido.

Empresas brasileiras responsáveis por genotipagem de proteínas do leite e melhoramento genético do rebanho notam um aumento da demanda por serviços do setor, tal fato se dá pela importância que a qualidade do leite vem ganhando, bem como a necessidade de se manter no mercado competitivo internacional.

Logo, há uma perspectiva que com maior disseminação da importância da seleção genômica maior a probabilidade de inserção da bonificação por produção de sólidos, como o teor de proteína. Pois seria de interesse econômico para o produtor ao selecionar seu rebanho e, dessa forma, obter maior rendimento a partir desta seleção e, também, seria interessante para os laticínios que ao aderir tal remuneração em seu portfólio, obteriam maior rendimento em seus produtos finais.

Também é importante ressaltar o benefício trago a saúde da sociedade ao ingerir produtos com melhor qualidade nutricional e com menor chance de causar doenças. Uma vez que os genótipos das proteínas do leite estão associados a estes fatores. Além disso, o Brasil estaria alinhado com as tendências do comércio mundial, já que em países desenvolvidos há uma grande valorização econômica das proteínas do leite, ou seja, há uma remuneração justa paga por sólidos do leite (como proteínas e gorduras). O que facilitaria a exportação, devido à grande produção brasileira de lácteos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRON. Agronegócios Online. Melhoramento genético de ovinos. 2016. Disponível: <<http://www.agron.com.br/publicacoes/informacoes/artigostecnicos/2016/11/08/051170/melhoramento-genetico-de-ovinos.html>>. Acesso em: 27 de maio de 2017.

ALENCAR, M. M. *Perspectivas para o melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil*. EMBRAPA – Pecuária Sudeste. São Carlos-SP, 2004.

ALEXANDER, L. J.; HAYES, G.; BAWDEN, W.; STEWART, A. F.; MACKINLAY, A. G. Complete nucleotide sequence of the bovine β -lactoglobulin gene. **Animal Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 110, 1993.

BERGMANN, J. A. G. Avaliação Genética - Conceitos Básicos. In: Congresso Brasileiro das Raças Zebuínas, 1º, Anais, ABCZ, Uberaba, M.G., 1994. p.34-41.

BEUZEN, N. D.; STEAR, M. J.; CHANG K, C. Molecular markers and their use in animal breeding. **The Veterinary Journal**, v. 160, p. 42-52, 2000.

BLOOM, M. V.; FREYER, G. A.; MICKLOS, D. A. *Laboratory DNA Science: an introduction to recombinant DNA techniques and methods of genome analysis*. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company 2002.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. *Marcadores moleculares*. Viçosa-MG: UFV, 532p., 2006.

BOTARO, B. G. *Variantes genéticas de β -lactoglobulina em vacas leiteiras e características físico-químicas e de composição do leite*. Programa de Pós-Graduação em Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pirassununga-SP, 2007.

BRAUNITZER, G.; CHEN, R.; SCHRANK, B.; STANGL, A. *Sequence analysis of β -lactoglobulin*. *Hoppe-Seyler's newspaper for physiology and chemistry*, v. 353, p. 832-834, 1972.

BRASIL, R. B.; NICALAU, E. S.; CABRAL, J. F.; SILVA, M. A. P. *Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino*. *Ciência Animal*, v.2, p. 71-80, 2015.

BRITO, L. F. Como o melhoramento genético pode modificar a qualidade do leite. Centro de Inteligência do Leite. Ano 4, número 38. EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora-MG, 2010.

BROWN, T. A. *Clonagem gênica e análise de DNA: Uma introdução*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

BUTLER, J. M. Short tandem repeat analysis for human identity testing. **Current Protocols in Human Genetics**, v.4 , p.14-22, 2005.

CANAL RURAL, 2016. Agropecuária brasileira deve seguir em alta em 2017. Disponível em: < <http://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/agropecuaria-brasileira-deve-seguir-alta-2017-63855>>. Acesso em: 22 de fevereiro 2017.

CHEN, B. Y.; JANES, H.W. *PCR cloning protocols*. 2nd Edition. Humana Press, p.192-439, 2002.

COELHO, E. G. A.; OLIVEIRA, D. A. A.; TEIXEIRA, C. S.; SAMPAIO, I. B. M.; RODRIGUES, S. G.; ALVES, C. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.111-115, 2004.

COUTINHO, L. L.; JORGE, E. C.; ROSARIO, M. F.; MOURA, A. S.; LEDUR, M. C. *Genômica Animal*. São Paulo: ESALQ/USP., 2010.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles – Review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, p. 2265–2272, 2011.

DAMIANI, G., PILLA, F., LEONE, P., CACCIO, S. Direct sequencing and bidirectional allele specific polymerase chain reaction of the bovine -casein B variant. **Animal Genetics**, v. 23, p. 561–566, 1992.

DHEDA K, HUGGETT JF, BUSTIN SA, JOHNSON MA, ROOK G, ZUMLA A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, v.4, p.37-112, 2004.

DE KRUIF, C. G.; GRINBERG, V. Y. Micellisation of β -casein. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 210, p. 183-190, 2002.

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

DE KRUIF, C. G.; HUPPERTZ, T.; URBAN V. S.; PETUKHOV A. V. Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 171–172, p. 36–52, 2012.

DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics if whey proteins in foods products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 597-608, 1998.

DIAS-SALMAN, A. K., MUSSOLINI-LAUREANO, M. M. Protocolos para extração de DNA genômico de amostras de pêlo de bovinos. Porto Velho. 2006. Circular técnica 87. p. 6.

ECKERSALL, P. D. *Proteins, proteomics and the dysproteinemias*. In: KANEKO J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6ed. Burlington: Academic Press. p.117-155, 2008.

EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 3, p. 178-183, 1990.

ELLIOT, R. B., et al. Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. **Diabetologia**, v. 42, p. 292-296, 1999.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora – MG. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/gado-de-leite>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2017.

LEAL, A.; CRISTALDO, H. Cerca de 40% da população do país tem intolerância à lactose. EXAME, 2013. Disponível em: < <http://exame.abril.com.br/brasil/cerca-de-40-da-populacao-do-pais-tem-intolerancia-a-lactose/>>. Acesso em: 10 de agosto de 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agriculture Outlook 2013-2022. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/agri_outlook2013>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2017.

FARRELL JR, H. M.; MALIN, E. L.; BROWN, E. M.; QI, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 135-147, 2006.

FILHO, J. L. A.; FONTES, R. M. O. *A formação da propriedade e a concentração de terras no Brasil*. Departamento de Economia da Universidade federal de Viçosa – MG. 2009.

FRANCO, M. M.; MELO, E. O. *Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida*. Brasília. DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 14 p.

GARCIA, J. F.; PORTO-NETO, L. P. Practical considerations on somatostatin analogs in embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. **Theriogenology**, v. 56, p. 1393-1399, 2001.

GOBBETTI, M., STEPANIAK, L., ANGELIS, M., CAGNO, R. *Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. v. 42, p. 223–239, 2002.

GODDARD, M. Genetics to improve milk quality. Australian Journal of Dairy **Technology**, v. 56, n. 2, p. 166-170, 2001.

GOFF, H. D. University of Guelph. Dairy Science and Technology. [online], 2009. Disponível em: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/dairy-science-and-technology/dairy-chemistry>

and-physics. Acesso em: 12 de março de 2017.

GUIMARAES, M. F. M.; MELLO, F.; FONSECA, I.; FREITAS, A. F.; ARBEX, W.A.; SILVA, M. V. G. B. Marcadores Genéticos no Melhoramento Animal. Girolando – Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, 2010. Disponível em: <<http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/tecnico,36>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2017.

HAMBLING, S.G.; MCALPINE, A.S.; SAWYER, L. beta-lactoglobulina. In: FOX, P. F. ALAONDON: Advanced Dairy Chemistry v.1, p.141-189, 1992.

HEID, C.A., S., J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature**, v.11, p. 1026-1030, 1993.

HOFF-OLSON, P., Mevag, B., Staalstrom, E. *Extraction of DNA from decomposed human tissue: an evaluation of live extraction methods for short tandem repeat typing*, Forensic Science International, v. 105, p. 171-183, 1999.

HOY, M. A. *DNA amplification by the Polymerase Chain Reaction: molecular biology made accessible. Insect molecular genetics: an introduction principles and applications*. San Diego: Academic Press, 1994. p.203-244.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário 2006. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. 146 p. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuario.pdf>>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2017.

IFCN. International Farm Comparison Network. Word Dairy Map 2014. Kiel: 2014. 1. mapa. Disponível em: <<http://www.ifcndairy.org/en/start/index.php>>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2017.

ISFH - INTERNATIONAL SOCIETY FOR FORENSIC HAEMOGENETICS. Recommendations of the DNA commision of the international society for forensic haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphism. **Forensic Science International**, v. 55, n. 1, p. 1-3,1992.

JUNG, H. et al. Color characteristics of *Monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1302-1306, 2003.

KERDNA. Genética. Disponível em: <<http://biologia-molecular.info/genetica.html>>. Acesso em: 25 de março de 2017.

KOCHAN, K. J., Amaral, M. E., Agarwala, R., Schaffer, A. A. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. *BMC Genomics*, v. 9, p. 631, 2008.

LIEN, S.; ALESTROM, P.; KLUNGLAND, H.; ROGNE, S. Detection of multiple β -casein alleles by amplification created restriction sites (ACRS). *Animal Genetics*, v. 23, p. 333–338, 1992.

LIMA, A. C. J. e LARA, M. A. C. *Polimorfismo do gene β -caseína em bovinos*. Instituto de Zootecnia, Centro de Genética e Reprodução Animal, URL-Genética, Nova Odesa-SP, Brasil, 2015.

LIMA, Y. V. R. Variantes genéticas de kappa-caseína em vacas leiteiras e características físico-químicas e de composição do leite. Departamento de Nutrição e Produção Animal - USP. Pirassununga-SP, 2005.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, v.25, p. 402-408, 2001.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interfaces Science*, v. 15, p. 73–83, 2010.

LO, Y. M. D., CHIU, R. W. K., CHAN, K. C. A. *Clinical applications of PCR*. Clinical Applications of PCR, 2nd ed. New Jersey, 211p., 2006.

LODISH, H. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. W.H. Freeman and Company, p.361. New York, 1999.

LUTZ, S. Beyond directed evolution-semi-rational protein engineering and design. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 734-743, 2010.

MADALENA, F. E. *Estratégias de uso de recursos genéticos visando melhorar a qualidade do leite e derivados*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 7, Anais. São Carlos : SBMA, 2008. São Carlos, 2008.

MARENGONI, N. G.; MACHADO, M. R. F.; GASPARINO, E. Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleósteos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 27, n. 1, p. 99-106, 2006.

MC LACHIAN, C. N. S. beta-casein A1, ischemic heart disease mortality and other illness. *Medical Hypotheses*, v. 56, p. 262-272, 2001.

MACKAY, I. M., MACKAY, J.F., NISSEN, M.D., SLOOTS, T.P. *Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay*, p.1-40, I.M. (Ed.), *Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2007.

MIGUEL, A. *Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogênicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL*. Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico de Lisboa. Lisboa, 106 pp., 2007.

MUÑOZ, J. E.; ALVAREZ, L. A. As novas técnicas moleculares aperfeiçoam os processos de fabricação do queijo. Science Colombia. Palmira, Colômbia, 2009.

NAOUM, P. C. *Eletroforese: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas e DNA*. São Paulo: Editora Santos. 2012, 301p.

NG-KWAI-HANG, K. F. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationships with production traits, milk composition and technological properties. Canadian Journal of Animal Science, v. 78, p. 131-147, 1998.

NG-KWAI-HANG, K. F.; OTTERM D. E.; LOWE, E.; BOLAND, M. J.; AULDIST, M. J. Influence of genetic variants of β -lactoglobulin on milk composition and size of casein micelles. Milchwissenschaft, v. 57, n. 6, p. 303-306, 2002.

NICÉSIO, R. G. Eletroforese, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedicinabrasil.com/2010/10/eletroforese.html>>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2017.

NOVAIS, C. M.; SILVA, F. F.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 33, p. 10-13. 2004.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Composição do leite com instabilidade da caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 180-182, 2006.

OUTLOOK FIESP 2023: projeções para o agronegócio brasileiro. Departamento de Agronegócio – DEAGRO. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo- São Paulo: FIESP, 2013. 115 p.

PACKER, I. U.; PAZ, C. P. Impactos da biotecnologia no melhoramento animal. In: MATTOS, W. R. S. et al. (Ed.). A produção animal na visão dos brasileiros. Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 717-727.

PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. **Journal Science Technology**, v. 27, p. 201-212, 2005.

PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J. P. *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Springer Netherlands, 2008, 332 pp.

PEREIRA, J. C. C. Melhoramento Genético aplicado à Produção Animal. Escola de Veterinária da UFMG. FEPMVZ Editora. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. Escola de Veterinária da UFMG. Belo Horizonte-MG, 2008.

PONCHEL, F., TOOMES, C., BRANSFIELD, K., LEONG, F. T., DOUGLAS, S. H., FIELD, S. L. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*, v.13, p3-18, 2003.

RAHIMI Z., GHOLAMI M., RAHIMI Z., YARI K. Evaluation of β -casein locus for detection of A1 and A2 alleles frequency using allele specific PCR in native cattle of Kermanshah, Iran. *Biharean Biologist*, v. 9, art.141136, 2015.

REDES – Redes para o Desenvolvimento Sustentável, Setor leiteiro busca melhorar qualidade em cenário de crescimento. Disponível em: <<http://www.programaredes.com.br/setor-leiteiro-busca-melhorar-produtividade-e-qualidade-em-cenario-de-crescimento/>> Acesso em 07 de junho de 2017.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília, DF: EMBRAPA, 2001. 213 p.

RIVAS, M. A., HARBOUR, M. G. MaRTE OS: An ada kernel for real-time embedded applications. *Lecture Notes In Computer Science*, v. 2043, p. 305-316, 2001.

ROMANO, E.; MIRANDA, A. C. B. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.2, n.9, p.40-43, 1999.

RUBEZ, J. A era dos sólidos totais. 2004. Disponível em: <http://www.leitebrasil.org.br/artigos/jrubez_094.htm>. Acesso em: 12 de maio de 2017.

SAIKI, R. K. Amplification of genomic DNA. In: IINNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKI, J. J.; WHITE, T. J (Ed.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990. p.13-20

SCHAEFFER, L. R. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 123, n. 4, p. 218-223, 2006.

SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf[®] Mastercycler[®]. Eppendorf North America, Apr. 8. 2003. Disponível em: <http://www.eppendorfna.com/applications/PCR_appl_protocolsMC.asp> acesso em: 22 de fevereiro de 2017.

SILVA, M. V. G. B. Seleção Genômica aplicada na pecuária de leite. Informação técnica. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012 (não publicado).

SHARMA, V., SHARMA, N., JAWED, B., NAUTIYAL, S.C. High resolution melt curve

analysis for the detection of κ -casein variants in Indian cows. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 3, p. 44-148, 2013.

SOLLERO, B. P.; FARIA, D. A.; PAIVA, S. R.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; PAIXÃO, D. M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 6., CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 13., 2004. Brasília. Anais... Brasília: SBZ, 2004. CD-ROM.

SCHMUTZ, J.; GRIMWOOD, J. Fowl Sequence. **Nature**, v.432, p.679-680, 2004.

SULIMOVA, G., AZARI, M.A., ROSTAMZADEH, J., ABADI, M.M., LAZEBNY, O. Casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. **Russian Journal of Genetics**, v. 43, p. 73-79, 2007.

STEWART, A.F., BONSHING, J., BEATTIE, C.W., SHAH, F., WILLIS, I.M., MACKINLEY, A.G. Complete nucleotide sequences of bovine α 2- and β -casein cDNAs: comparison with related sequences in other species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 231–241, 1987.

TAYLOR, C.; FORD, K.; CONNOLLY, B. A.; HORNBY, D. P. Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. **The Biochemical Journal**, v. 291, n. 2, p. 493–504, 1993.

VERCESI FILHO, A. E.; CAMARGO, G. M. F.; CARDOSO, D. F.; ZADRA, L. F.; FERNANDES, A. R.; TONHATI, H. Identificação de alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína na raça Gir Leiteiro. IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012.

VERONEZI, A. B. S.; ROTONDO, B. R.; GUABERTO, L. M.; ARAUJO, D. S.; MARTINS, T. R. Genotipagem do gene kappa caseína e sua influência na porcentagem de caseína e produção de queijo fresco. Zootec – ABZ – Associação Brasileira de Zootecnistas. Santos-SP, 2017.

VERNEQUE, R. S., PEIXOTO, M. G. C. D., MACHADO, M. A. *Melhoramento genético de gado de leite*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 7, Anais. São Carlos: SBMA, 2008. São Carlos, 2008.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review of SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 275-305, 2002.

VILELA, D.; RESENDE, J. C. *Cenário para a produção de leite no Brasil na próxima década*. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, 2015.

YANG, W., KANG, X., YANG, Q., LIN, Y. AND FANG, M. Review on the development of

genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 4, p. 2, 2013.

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. *Guia de rotas na tecnologia do gene*. São Paulo: Atheneu Editora, 1999, p.334.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, v. 9, p. 189-192, 1999.

WATTIAUX, M. A. Composição do leite e seu valor nutricional. In: Essenciais em gado de leite; Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional University of Wisconsin-Madison. 2014. Disponível em: <<http://www.universidadedoleite.com.br/artigo-composicao-do-leite-e-seu-valor-nutricional>>. Acesso em: 29 de maio de 2017.

WATZINGER, F., EBNER, K., LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 254-298, 2006.

WEINMANN. *PCR quantitativa em tempo real*. Biologia Molecular. 2009. Disponível em: <<http://www.publicacoesweinmann.com.br/2009/04/pcr-quantitativo-em-tempo-real.html>>. Acesso em: 29 de maio de 2017.

WELLER, I.J. 1994. Economic aspects of animal breeding, London: Chapman & Hall. 246p.

WIGGANS, G. R. Derivation, calculation, and use of national animal model Information. *Journal Dairy Science.*, v. 74, p. 2737-2746, 1993.

ZOCCAL, R. Conjuntura do Mercado Lácteo. Centro de Inteligência do Leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/content/conjuntura-do-mercado-l%C3%A1cteo>> Acesso em: 27 de maio de 2017.

ZOCCAL, R. Alguns números do leite. Balde Branco. Centro de Inteligência do Leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2016. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/content/conjuntura-do-mercado-l%C3%A1cteo>> Acesso em: 02 de agosto de 2017.