PEIXOTO JÚNIOR, K.C. et al. Efeito do tempo de congelamento do leite de cabra "in natura" sobre a concentração de nitrogênio na forma de uréia. **PUBVET**, Londrina, V. 7, N. 18, Ed. 241, Art. 1594, Setembro, 2013.

PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Efeito do tempo de congelamento do leite de cabra "in natura" sobre a concentração de nitrogênio na forma de uréia

Kleber da Cunha Peixoto Júnior¹; Paulo César Pavia²; Patrícia Moura da Cunha³; Fernanda Andolfatto Nunes⁴; Jerusa Martins Garcia⁴; Raquel Siqueira Depolito⁴; Talita Barros Cozzatti⁴

¹ Professor titular da Universidade de Santo Amaro, Universidade Metodista de São Paulo e Universidade Paulista

² Professor titular da Universidade Anhembi Morumbi

³ Médica Veterinária da Universidade Metodista de São Paulo

⁴ Graduandas Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Metodista de São Paulo

Resumo

O nitrogênio uréico no leite (NUL) trata-se de medida integrada do metabolismo da utilização da proteína (degradada e não degradada no rúmen), envolvendo ingestão e disponibilidade de energia. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tempo de congelamento do leite de cabra "in natura" sobre a concentração de nitrogênio na forma de uréia. Para isto, foi colhida uma amostra de 200 ml de leite "in natura" de 30 cabras. Esta amostra foi dividida em 6 sub-amostras de 10 ml, uma foi analisada in natura e as outras 5 congeladas e analisadas após 30, 60, 90, 120 e 150 dias de congelamento. Os resultados foram analisados através de análise de variância. Não houve

diferença entre a concentração de NUL do leite fresco e após 30, 60 e 90 dias de congelamento, sendo obtidos valores iguais a 22,69; 23,44; 25,03 e 24,67mg/dl, respectivamente. O nível de NUL após 120 dias foi 26,70mg/dl, concentração esta estatisticamente semelhante a 60 e 90 dias de congelamento e diferente do leite "in natura" e após 30 e 150 dias de congelamento. Já concentração de NUL após 150 dias foi estatisticamente superior a todos os tempos avaliados, concluindo que a concentração de NUL de cabra "in natura" congelado permanece inalterado por até 90 dias, sofrendo elevação após 120 dias.

Palavras-chave: leite de cabra, nitrogênio não protéico, nitrogênio uréico no leite, ruminantes

Effect of the time of freezing of the "in natura" goat milk on the nitrogen concentration in the urea form

Abstract

The milk urea nitrogen (MUN) is an integrated measure of metabolism of the use of the protein (degraded and not degraded in rumen), involving ingestion and availability of energy. The objective of this work was to evaluate the effect of the time of freezing of the goat milk "in natura" on the nitrogen concentration in the urea form. For this, 200 ml of "in natura" milk of 30 goats was harvested. This samples was divided in 6 samples with 10 ml, one was analyzed in natura and the others freezed and analyzed 30, 60, 90, 120 and 150 after days of freezing. The results had been analyzed through variance analysis. It did not have difference between the concentration of MUN of cool milk and after 30, 60 and 90 days of freezing, being gotten equal values the 22,69; 23,44; 25,03 and 24,67mg/dl, respectively. The MUN level after 120 days was 26,70mg/dl, concentration statistically similar in the 60 and 90 days, different of milk "in natura" and after 30 and 150 days of freezing. Already MUN concentration after 150 days was statistically superior to all the evaluated

times, concluding that the concentration of MUN of goat "in natura" frozen, remains unchanged for up to 90 days, suffering rise after 120 days.

Keywords: goat milk, non proteic nitrogen, MUN, ruminants,

Introdução

Segundo Oliveira et al. (2002) pode ocorrer variação na composição do leite de cabra em função de características como: raça, indivíduo, estado de lactação e alimentação da cabra.

O nitrogênio uréico no leite (NUL), trata-se de medida integrada do metabolismo da utilização da proteína (degradada e não degradada no rúmen), envolvendo ingestão e disponibilidade de energia (CARLSSON e PEHRSON, 1993). Altos níveis de NUL indicam além dos reflexos negativos na produção, excessos de proteína na dieta e maior custo de alimentação (ARIAS e ALONSO, 1998). Alguns fatores podem influenciar na concentração de NUL, como hora da colheita durante o dia; conservação da amostra; variações entre os quartos; influência da contagem de células somáticas e centrifugação (EICHER et al., 1999). Segundo EICHER et al. (1999) a conservação do leite por uma semana a 4°C fez com que ocorresse um leve, mas significativo aumento na concentração de NUL; o mesmo ocorreu após um mês de congelamento (-20°C).

Santana et al. (2001) relataram que as baixas temperaturas não evitam a proteólise e a lipólise realizadas pelos microrganismos psicrótrófos presentes no leite, o que segundo Santos e Carvalho (2000) provocam alteração de sabor por modificarem suas constituições de gordura e proteína e diminuição do rendimento na fabricação de queijo. Por outro lado, Oliveira et al. (2002) observaram que os parâmetros físico-químicos do leite de cabra pasteurizado não congelado e congelado até 90 dias, não apresentam alterações significativas ao nível de 5%.

A uréia é uma molécula orgânica, composta de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio (FERGUSON, 1997), pequena, solúvel em água,

permeável a todas as células e tecidos (GUSTAFSSON e PALMQUIST, 1993). É um constituinte comum do sangue e outros fluidos, não sendo tóxica para o organismo, podendo estar presente em níveis elevados sem causar problemas graves. Se a uréia não fosse produzida a partir da amônia, todas as vezes que ocorresse ingestão de proteína, os seres vivos se intoxicariam (FERGUSON, 1999).

A concentração de uréia no sangue pode flutuar do início ao fim do dia, atingindo maiores valores em torno de 4 a 6 horas após, e menores imediatamente antes da alimentação. Desde que o leite seja coletado duas a três vezes por dia, sua concentração de uréia é levemente menos volátil que a uréia do sangue. Entretanto, quando comparadas amostras de leite coletadas no período da manhã e da tarde, a concentração de uréia no leite refletirá o tempo decorrido entre a alimentação e a coleta (FERGUSON, 1999). De acordo com dados apresentados pelo mesmo autor, o nitrogênio uréico do leite de amostras coletadas na parte da manhã, aproxima-se mais da média do rebanho que de amostras coletadas à tarde.

De acordo com DePeters e Cant (1992), a proteína láctea verdadeira compreende a fração sintetizada dentro da glândula mamária (caseína) e as porções pré-formadas no sangue (albumina), podendo ser dividida em 3 frações; O nitrogênio na forma de caseína, o nitrogênio da proteína do soro e o nitrogênio não protéico (NNP).

DePeters e Cant (1992) relataram que a fração NNP do leite é a menos entendida até o momento, sendo que 35% dos componentes do NNP permanecem indefinidos. A maior porção do NNP é o nitrogênio na forma de uréia (48%), o qual entra livremente na glândula mamária por difusão para equilibrar sua concentração com a do plasma sanguíneo.

Muitos fatores podem alterar a distribuição do nitrogênio entre as várias frações nitrogenadas do leite (DePETERS e CANT, 1992), tais como clima (ambiente), doenças do úbere, estágio de lactação, parto, raça e nutrição (LANBEN, 1963; ROOK, 1961). A importância de cada um destes fatores na secreção do leite é difícil de determinar, mas Franke et al. (1988) sugeriu

interação entre eles, que pode alterar drasticamente a composição do nitrogênio do leite.

A concentração de nitrogênio uréico do leite (NUL) pode ser uma ferramenta útil para monitoração do manejo nutricional de rebanhos leiteiros (FAUST e KILMER, 1996).

As concentrações de NUL podem ser mensuradas através de alguns métodos. Existem essencialmente três grupos de métodos usados para a determinação do NUL, classificados como: 1) métodos mistos, 2) métodos baseados em reações com diacetyl-monoxime ou componentes similares, 3) métodos empregando urease. Os métodos que empregam diacetyl-monoxime e urease se tornaram os mais populares (CORNELL UNIVERSITY, 1977).

GODDEN et al. (2001) e FAUST e KILMER (1996) utilizaram em seus trabalhos o método Infrared (IR). Este método foi introduzindo nos anos 90 oferecendo meios rápidos e baratos de mensuração da uréia no leite. Já Eicher et al. (1999), utilizou o método enzimático cinético (urease/ glutamato dehidrogenase).

Alguns fatores podem influenciar na concentração de NUL, como hora da colheita durante o dia; conservação da amostra; variações entre os quartos; influência da contagem de células somáticas e centrifugação (EICHER et al., 1999).

Segundo Eicher et al. (1999), as concentrações NUL não variam significativamente pela manhã, enquanto Godden et al. (2001), relatou uma menor concentração pela manhã devido um maior espaço de tempo entre a alimentação dos animais e coleta das amostras do que pela tarde onde o espaço de tempo é menor.

A conservação da amostra mostrou que após uma semana de refrigeração (4°C) a concentração de NUL apresentou um leve, mas significativo aumento; ocorrendo o mesmo após um mês de congelamento (-20°C); a variação entre quartos foi irrelevante. Os resultados não mostraram nenhum efeito da contagem de células somáticas sobre a concentração de NUL

(EICHER et al., 1999). Enquanto Faust e Kilmer (1996) acharam concentrações menores de NUL para amostras com maior contagem de células somáticas.

Após centrifugação, a concentração de NUL da amostra total de leite mostrou valores muito inferiores em relação às amostras de lactosoro correspondentes (EICHER et al., 1999).

Eicher et al. (1999), em seu trabalho, concluiu que a concentração de NUL só varia significativamente pela tarde quando diminui, sendo preferível colher as amostras pela manhã de 2 a 4 horas após o alimento concentrado. Nesse caso, as amostras da tarde devem ser corrigidas para interpretação.

Em alguns casos, pode ser útil analisar amostras da manhã e tarde, para se visualizar uma indicação das mudanças dinâmicas da circulação de NUL esperado por inadequada quantidade de alimento concentrado (EICHER et al., 1999).

O NUL é mensurado em leite total, qualquer resultado menor que 2 mmol/L deve ser interpretado com cautela ou repetido em análise de lactosoro (EICHER et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tempo de congelamento do leite de cabra "in natura" sobre a concentração de nitrogênio na forma de uréia.

Materiais e métodos

Foi colhida uma amostra de 200 ml de leite "in natura" de 30 cabras diretamente dos tetos dos animais. Esta amostra foi dividida em 6 sub-amostras de 10 ml que foram acondicionadas em caixa de isopor e transportadas para o Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária da UESP onde uma foi analisada in natura e as outras 5 congeladas e analisadas após 30, 60, 90, 120 e 150 dias de congelamento. Em todas as amostras foi analisado o NUL através do método enzimático utilizando o kit de análise de uréia sérica LABTEST conforme PEIXOTO JR (2003). Este método empregado para análise do nitrogênio ureico do leite foi semelhante ao

Sigma Diagnostic Kit (640-A) conforme Eicher et al. (1999) que sugeriram ser possível realizar análises de uréia em amostra de leite integral utilizando método enzimático.

As amostras de leite foram centrifugadas a uma rotação de 4000rpm por 20 minutos. Em seguida o lactossoro foi retirado e realizou-se a análise de nitrogênio ureico.

Os procedimentos para a dosagem de uréia no lactossoro consistiram em diluir (1:50) 1 parte da amostra em 49 partes de água destilada ou deionizada (0,1 ml de lactossoro + 4,9 ml de água destilada ou deionizada). Sendo, no final, multiplicado o resultado obtido por 50.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 2,0 ml. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculos se mantenham inalterados. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica.

Cálculos:

$$\text{Uréia (mg/dl)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 70$$

Devido à grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de calibração} = \frac{70}{\text{Absorbância do padrão}}$$

$$\text{Uréia (mg/dl)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{Fator}$$

Linearidade:

O resultado da medição é linear até 300 mg/dl. Quando a absorbância do teste for maior que 1,0 diluir o produto corado e o branco 1:5 com água destilada ou deionizada, fazer nova leitura e multiplicar o resultado obtido por 5. Se após a diluição for obtido um valor igual ou maior que 300 mg/dl, diluir a

amostra com NaCl 150 mmol/l (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição. Diluir a amostra de tal modo que o valor encontrado se situe entre 50 e 100 mg/dl.

O resultado obtido ao final do teste foi a concentração de uréia em mg/dl, este valor deverá ser multiplicado por 0,466 para obtermos o NUL.

Os resultados foram analisados através de análise de variância utilizando-se o método dos quadrados mínimos empregando-se o procedimento PROC GLM do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2001). Os modelos significativos foram submetidos ao teste TUKEY de comparação de médias.

Resultados e discussão

Houve efeito significativo do tempo de congelamento sobre a concentração de nitrogênio uréico do leite. A concentração de NUL média, observada para o leite "in natura", fresco e após 30, 60, 90, 120 e 150 dias de congelamento pode ser observadas na tabela ao lado. Não houve diferença entre a concentração de NUL do leite fresco e após 30, 60 e 90 dias de congelamento, sendo obtido valores iguais a 22,69, 23,44, 25,03 e 24,67mg/dl respectivamente. O nível de NUL após 120 dias de congelamento foi 26,70mg/dl, concentração esta estatisticamente semelhante a 60 e 90 dias de congelamento e diferente do leite "in natura" e após 30 e 150 dias de congelamento. Já concentração de NUL após 150 dias de congelamento foi estatisticamente superior a todos os tempos avaliados.

Estes resultados confirmam as conclusões de Oliveira et al. (2002) que relatam que os parâmetros físico-químicos do leite de cabra pasteurizado não congelado e congelado até 90 dias não sofrem alterações, ou seja, os valores em percentagem de proteínas não demonstrou variações significativas durante este período, o que pode ser observado pela não variação do NUL. No entanto, este trabalho utilizou leite "in natura" e Oliveira et al. (2002) leite pasteurizado. O aumento dos níveis de NUL após 120 dias de congelamento

(tabela 1) observado neste trabalho pode ser explicado através dos achados de Santana et al. (2001). Estes autores relataram que em baixas temperaturas os microrganismos psicotróficos realizam proteólise e lipólise, comprometendo a qualidade do leite e de seus derivados, como queijos e iogurtes, que dependem da coagulação das proteínas para sua produção. Esta conclusão é confirmada pelo presente trabalho, já que o aumento dos níveis de uréia no leite após 120 dias demonstra a ação proteolítica das bactérias.

Segundo Santana et al. (2001), os microrganismos proteolíticos mais comuns pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Xanthomonas* e *Cytophagei*.

Os resultados observados neste trabalho diferem dos observados por Eicher et al., (1999), que, embora trabalhando com leite de vacas holandesas de alta produção, observaram que após uma semana de refrigeração (4°C) a concentração de NUL apresentou um leve, mas significativo aumento; ocorrendo o mesmo após um mês de congelamento (-20°C).

Tabela 1 - Efeito do tempo de congelamento sobre a concentração de nitrogênio uréico do leite de cabra

Tempo de congelamento	Número de observações	NUL (mg/dl)
0	62	22,69 ^a
30	62	23,44 ^a
60	62	25,03 ^{ab}
90	59	24,67 ^{ab}
120	62	26,70 ^b
150	62	30,22 ^c

* Letras iguais na mesma coluna são semelhantes estatisticamente (P>0,05)

PEIXOTO JÚNIOR, K.C. et al. Efeito do tempo de congelamento do leite de cabra "in natura" sobre a concentração de nitrogênio na forma de uréia. **PUBVET**, Londrina, V. 7, N. 18, Ed. 241, Art. 1594, Setembro, 2013.

Estes dados demonstram que o uso apenas do congelamento para a conservação do leite "in natura" não é suficiente, sendo necessária a associação de outros métodos para diminuir a sua contaminação, preservando melhor as suas características para posterior uso pela indústria.

Como o NUL está sendo utilizado frequentemente como ferramenta para avaliar a dietas dos animais, quantidades cada vez maiores de amostras de leite estão chegando aos laboratórios para análise. Como a análise da uréia através do método enzimático é demorada, algumas amostras de leite necessitam ser congeladas para posterior análise. Este trabalho mostra que as amostras podem ficar congeladas por até 90 dias alterar a concentração de NUL.

Conclusão

A concentração de nitrogênio ureico do leite (NUL) de cabra "in natura" congelado permanece inalterado por até 90 dias, sofrendo elevação após 120°.

Referências

ARIAS, J.; ALONSO, A. N. Importância dos níveis de nitrogênio uréico no leite e no sangue de vacas leiteiras p.73-84, 1998.

CARLSSON, J.; PEHRSON, B. The relationship between seasonal variations in the concentration of urea in bulk milk and the production and fertility of dairy herds. **J. Vet. Med.**, v. .40, p. 205-212, 1993.

CORNELL UNIVERSITY. Auto Analyser II. 1977.

DePETERS, E.J.; CANT, J.P. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. **J. Dair. Sci.**, v. 75, p. 2043-2070, 1992.

EICHER, R.; BOUCHARD, E.; TREMBLAY, A. Cow level sampling factors affecting analysis and interpretation of milk urea concentration in 2 dairy herds. **Can. Vet. J.**, v. 40, p. 487-492, 1999.

FAUST, M.A.; KILMER, L.H. Determining variability of milk urea nitrogen reported by commercial testing laboratories. **Dairy Report**, 1996.

FRANKE, A. A.; BRUHN, J.C.; LAWRENCE, C.M. Distribution of protein in California milk in 1983, **J. Dair. Sci.**, v.71, p.2373, 1988.

FERGUSON, J. D. [About MUN. Documento eletrônico publicado em 1997 na internet]. Disponível em {<http://www.dhiqa.psu.edu/mun.htm>}. Acesso em: 15 Jan 1999.

GODDEN, S.M.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S.; LUMSDENS, J.H. Milk urea testing as a tool to monitor reproductive performance in Ontario dairy herds. **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 1397-1406, 2001.

GUSTAFSSON, A.H.; PALMQUIST, D.L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. **J. Dair. Sci.**, v. 76, p. 475-484, 1993.

LANBEN, R.C. Factors responsible for variation in milk composition. **J. Dair. Sci.**, v.46, p.1, 1963.

OLIVEIRA, J. M.; HIANE, P. A.; RAMOS, M. I. L. Características físico-químicas do leite de cabra pasteurizado e congelado, produzido em Campo Grande – MS. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 107-111, 2002.

OLTNER, R.; WIKTORSSON, H. Urea concentration in milk and blood as influenced by feeding varying amounts of protein and energy to dairy cows. **Livest. Prod. Sci.**, v. 10, p.457-467, 1983.

PEIXOTO JR, K. C. **Nitrogênio uréico do leite como indicador de desempenho reprodutivo de rebanhos leiteiros**. Tese de doutorado, 88p., FMVZ – USP, São Paulo, 2003.

ROOK, J.A.F. Variations in the chemical composition of the milk of the cow. Part 1. **Dair. Sci., abstr.** 23, p.251, 1961.

ROPSTAD, E.; VIK-MO, L.; REFSDAL, A. O. Levels of milk urea, plasma constituents and rumen liquid ammonia in relation to the feeding of dairy cows during early lactation. **Acta Vet. Scand.**, v. 30, p. 199 – 208, 1989.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Microrganismos psicrótrópicos em leite. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 27-33, 2001.

SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P. Presença de *Bacillus megaterium* em leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 78/79, p. 63-68, 2000.