

## Efeito do tempo de congelamento do leite integral e lactossoro sobre a concentração de nitrogênio ureico

### *Effect of time of freezing milk whey and integral about the urea nitrogen*

Kleber da Cunha Peixoto Jr\*  
Carlos Souza Lucci\*\*  
Gabriel da Rocha Silvestrini\*\*\*  
Maria Gabriela M. Pereira\*\*\*  
Gilberto Bufarah\*\*\*\*  
Edson Valvassori\*\*\*\*  
Valter Fontolan\*\*\*\*\*

#### Resumo

**Introdução** – O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de períodos estocagem de amostras de leite integral, ou de soro de leite, nos resultados de nitrogênio ureico lácteo (NUL), e comparar os valores obtidos com aqueles correspondentes ao nitrogênio ureico sérico (NUS). **Material e Métodos** – Foram obtidos de 20 vacas mestiças lactantes 140 ml de leite e 20 ml de sangue. As amostras de leite foram subdivididas em dois tipos de manuseio: A) metade da amostra foi desengordurada e desproteïnizada, em seguida analisou-se o teor de nitrogênio ureico, guardando-se o restante para feitura da mesma análise em 14 subamostras, as quais foram congeladas para análise decorridos 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 e 330 dias após a colheita. B) a outra metade foi analisada quanto ao teor de nitrogênio ureico, guardando-se o restante para feitura da mesma análise em 14 subamostras, as quais foram congeladas decorridos os mesmos períodos de tempo considerados para a fase A. As amostras de sangue foram encaminhadas para análise dos teores de nitrogênio ureico sanguíneos imediatamente. **Resultados** – Não foi observado efeito do congelamento (até 330 dias) sobre a concentração de nitrogênio ureico no leite e no lactossoro. **Conclusão** – Conclui-se que o NU pode ser congelado por até 330 dias e ser analisado tanto no leite integral como no lactossoro.

Palavras-chave: Nitrogênio ureico do leite; Nitrogênio ureico do sangue; Bovinos; Controle de qualidade; Qualidade dos alimentos

#### Abstract

**Introduction** – The aim of this study was to evaluate the effects of storage periods of samples of milk, or whey, the results of milk urea nitrogen (MUN), and compare the values obtained with those corresponding to the serum urea nitrogen (SUN). **Material and Methods** – Were obtained from 20 lactating crossbred cows 140 ml milk and 20 ml of blood. The milk samples were subdivided into two types of handling: A) half of the sample was defatted and deproteinated then analyzed the concentration of urea nitrogen, keeping the rest was for making the same analysis on 14 core samples, which were frozen for analysis after 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 and 330 days after harvest. B) the other half was analyzed for urea nitrogen, keeping the rest was for making the same analysis on 14 core samples, which were frozen after the same time periods considered for phase A. Blood samples were sent for analysis of levels of blood urea nitrogen immediately. **Results** – There was no effect of freezing (up to 330 days) on the concentration of milk urea nitrogen and whey. However, there was a positive correlation ( $r = 0.8017$ ) between milk urea nitrogen and whey. **Conclusion** – Concluding that the UN can be frozen for up to 330 days and be analyzed in both whole milk and in whey.

Key words: Milk urea nitrogen; Blood urea nitrogen; Cattle; Quality control; Food quality

## Introdução

Incrementos na ingestão de proteína digestível, ou na relação proteína digestível/MJ de energia metabolizável (EM), aumentam os níveis de amônia no rúmen, mas no sangue estes valores mantêm-se baixos, devido à rápida

conversão hepática em ureia (ciclo da ornitina). Se a produção de amônia supera a capacidade hepática de transformá-la em ureia, seu nível no sangue pode atingir limites tóxicos<sup>1</sup>. No entanto, a elevação do conteúdo de ureia no sangue devido à conversão hepática de amônia a ureia pode provocar aumento no conteúdo de ureia do leite<sup>8</sup>. É

\* Professor Titular da Universidade Paulista (UNIP) e Universidade de Santo Amaro (Unisa). E-mail: kcpjunior@uol.com.br

\*\* Professor Titular da Unisa.

\*\*\* Bolsistas de Iniciação Científica da Unisa.

\*\*\*\* Pesquisador Doutor da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) – Nova Odessa.

\*\*\*\*\* Técnico do Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal da Unisa.

conhecida a existência de correlação íntima entre as concentrações de ureia no sangue e amônia no rúmen<sup>13,18</sup>.

O nitrogênio ureico do leite (NUL) indica a perda de nitrogênio na forma de amônia de origem da digestão microbiana dos alimentos no rúmen. Como os valores de NUL são intimamente relacionados com o nitrogênio ureico do sangue (NUS), o qual tem sido usado há muitos anos para avaliar os efeitos da dieta na taxa de concepção, o uso do NUL está se tornando uma importante ferramenta para os nutricionistas com finalidade de avaliar a eficiência da utilização de proteína em várias dietas<sup>14</sup>.

Muitos fatores podem alterar a distribuição do nitrogênio entre as várias frações nitrogenadas do leite<sup>5</sup>, tais como clima (ambiente), doenças do úbere, estágio de lactação, parto, raça e nutrição<sup>15,17</sup>. A importância de cada um destes fatores na secreção do leite é difícil de determinar, mas Franke *et al.*<sup>10</sup> (1988) sugeriram interação entre eles, que pode alterar drasticamente a composição do nitrogênio do leite.

A concentração de nitrogênio ureico do leite (NUL) pode ser uma ferramenta útil para monitoração do manejo nutricional de rebanhos leiteiros<sup>8</sup>. Assim, o interesse na mensuração do NUL tem aumentado muito e visa monitorar a eficiência da utilização do nitrogênio por vacas leiteiras. Fornecimento de proteína acima das necessidades nutricionais tem mostrado impacto negativo na saúde e fertilidade do gado leiteiro<sup>11</sup>.

Segundo Eicher *et al.*<sup>6</sup> (1999) 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. Segundo os autores, após centrifugação, a concentração de NUL da amostra total de leite mostrou valores muito inferiores em relação às amostras de lactossoro correspondentes.

Assim, o presente projeto teve como objetivos verificar o efeito do tempo de congelamento da amostra de leite integral e lactossoro sobre a concentração de nitrogênio uréico, comparando-as e quantificar nitrogênio ureico sanguíneo no início do experimento e correlacionar com a concentração de nitrogênio ureico do leite.

## Material e Métodos

Foram colhidas amostras de leite e de sangue em fazenda situada no município de Descalvado, Estado de São Paulo. Foram avaliados 20 animais, sendo colhidos 10 ml de sangue e 280 ml de leite de cada animal na primeira ordenha do dia, conforme observado por Eicher *et al.*<sup>6</sup> (1999).

Cada amostra total de leite foi dividida em 28 subamostras de 10 ml cada, 14 subamostras que foram refrigeradas enquanto as outras 14 foram centrifugadas à uma rotação de 4000 rpm por 20 minutos, onde houve a separação da gordura na superfície do tubo de ensaio que foi retirada por aspiração. Adicionou-se em seguida 5 gotas de ácido acético ao tubo com leite e fez-se a 2ª centrifugação para retirar toda proteína do leite, dando origem ao lactossoro isento de proteínas, após este processo foram refrigeradas. Todas as 28 subamostras foram levadas ao Laboratório da Universidade de Santo Amaro, onde uma subamostra de cada

tratamento foi analisada imediatamente e as outras 13 de leite integral e lactossoro foram congeladas a -20°C para posterior análise. Desta forma as análises das amostras foram realizadas nos tempos 0 (dia da colheita), 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 e 330 dias após a colheita.

As amostras de sangue foram centrifugadas a uma rotação de 4000 rpm por 20 minutos. Houve separação de plasma na superfície e hemácias que precipitaram para o fundo do tubo. Em seguida o soro foi retirado e realizou-se a análise de nitrogênio ureico.

As amostras de leite e lactossoro foram analisadas segundo metodologia da Universidade de Cornell, adaptada, utilizando o kit de análise de ureia sérica Labtest. O método a ser utilizado foi semelhante ao Sigma Diagnostic Kit (640-A).

O resultado obtido ao final do teste foi a concentração de ureia em mg/dl, este valor foi multiplicado por 0,466 para se obter o NUL.

O delineamento utilizado foi blocos ao acaso, sendo 2 blocos (leite integral e lactossoro) com 22 animais cada. Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System<sup>19</sup> (1985) sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e a homogeneidade das variâncias comparadas pelo Teste Qui Quadrado (Comando SPEC do PROC GLM). Os dados foram submetidos à análise de variância e correlação, utilizando o PROC GLM e o PROC CORR respectivamente, adotando o nível de significância de 5% para todas as análises realizadas.

## Resultados e Discussão

A correlação entre NUS e NUL observada neste trabalho (Tabela 1) contradiz a maioria da literatura consultada que afirma que ser positiva e elevada a correlação entre NUL e NUS<sup>1-2, 4,6,13</sup>, indicando que a base para o uso do NUL como indicador nutricional é a forte correlação existente entre o NUL e NUS, que ocorre devido à livre difusão da ureia nos tecidos orgânicos. A correlação entre NNP do leite e do plasma também tem sido descrita<sup>12</sup>.

**Tabela 1. Coeficiente de correlação de Pearson entre nitrogênio ureico do sangue e do leite**

	Número de amostras	NUL	NUS
NUL	40	1,000 0,0	-
NUS	40	0,165 0,1	1,000 0,0

Na prática considera-se que os valores de NUL representam entre 83 e 98% dos valores de NUS, aceitando que a divisão de NUL por 0,85 possa estimar com razoável precisão o valor de NUS<sup>1,3</sup>. Baker *et al.*<sup>2</sup> (1995) ao utilizarem vacas leiteiras produzindo entre 31,2 e 32,5 kg de leite/dia alimentadas com dietas variando a concentração de carboidratos e proteína degradável no rúmen (PDR) concluíram que a concentração de NUS e NUL tiveram correlação de 0,96, indicando que 93% da variação de NUL foi quantificada pela variação do NUS.

**Tabela 2. Efeito do tempo de congelamento sobre a concentração de nitrogênio ureico do lactossoro**

Período	Observações	Nitrogênio ureico do leite	Nitrogênio ureico do lactossoro
0	20	14,843 <sup>a</sup>	14,343 <sup>a</sup>
15	20	15,815 <sup>ab</sup>	14,976 <sup>ab</sup>
30	20	15,629 <sup>ab</sup>	15,858 <sup>b</sup>
60	20	15,938 <sup>b</sup>	15,958 <sup>ab</sup>
90	20	15,055 <sup>ab</sup>	14,940 <sup>ab</sup>
120	20	15,995 <sup>b</sup>	14,554 <sup>ab</sup>
150	20	15,232 <sup>ab</sup>	15,421 <sup>ab</sup>
180	20	14,747 <sup>a</sup>	14,735 <sup>ab</sup>
210	20	15,063 <sup>ab</sup>	14,341 <sup>a</sup>
240	20	15,973 <sup>b</sup>	15,097 <sup>ab</sup>
270	20	15,310 <sup>ab</sup>	15,082 <sup>ab</sup>
300	20	16,000 <sup>b</sup>	15,394 <sup>b</sup>
330	20	15,845 <sup>ab</sup>	15,958 <sup>ab</sup>
Total de amostras	260	–	–

\* Médias com letras semelhantes na mesma coluna são iguais estatisticamente ( $p < 0,0001$ )

O fato das amostras do presente trabalho terem sido obtidas na primeira ordenha do dia, ou seja, antes da primeira refeição pode explicar a baixa correlação observada entre NUL e NUS, já que Gustafsson e Palmquist<sup>13</sup> (1993) e Elrod e Butler<sup>7</sup> (1993) relataram flutuação na concentração de NUS, do início ao fim do dia, e que geralmente a concentração mínima de NUS ocorre antes da alimentação e a máxima, 4 a 6 horas após. Como existe diferença de aproximadamente 1 a 2 horas entre os picos de NUS e NUL<sup>17</sup>, o tempo de amostragem em relação à alimentação pode ser importante na interpretação dos valores, especialmente quando as vacas forem alimentadas com forragem e concentrados separadamente em vez de dieta total.

Como pode ser observado na Tabela 2, houve efeito do tempo de congelamento sobre a concentração de NU do leite e do lactossoro. No entanto, ao levar em consideração a classificação realizada por Peixoto Jr.<sup>16</sup> (2003) que classificou os níveis de nitrogênio ureico do leite em cinco classes; abaixo de 8 mg/dl, entre 8 e 12 mg/dl, 12,1 e 16 mg/dl, 16,1 e 19 mg/dl e acima de 19 mg/dl, nota-se que todos os valores obtidos pertencem à mesma classe, podendo, portanto, serem considerados semelhantes.

O tempo que a amostra de leite pode ficar congelada sem que a concentração de ureia seja alterada ainda

**Tabela 3. Coeficiente de correlação entre nitrogênio ureico do soro e do leite**

	Número de amostras	NUL	NULac
NUL	40	1,000 0,0	–
NULac	40	0,8018 0,0001	1,000 0,0

está indefinido, este trabalho aponta não haver alterações significativas por até um ano de congelamento. Eicher *et al.*<sup>6</sup> (1999) afirmaram que a presença de bactérias proteolíticas produzindo amônia interferindo com a reação enzimática pode ser responsável pelo aumento significativo do NUL em amostras após uma semana de refrigeração a 4°C e após um mês de congelamento a -20°C e Fernandez *et al.*<sup>9</sup> (1988) reportaram que o congelamento de amostras de plasma por várias semanas pode resultar em acréscimo de até 50% na concentração de amônia. Neste experimento o tempo médio de congelamento das amostras a -20°C foi 30 dias, o que poderia ter contribuído para o aumento dos níveis de NUL, entretanto, como os melhores resultados foram obtidos em animais com níveis de NUL abaixo de 8 mg/dl supõe-se que o tempo de congelamento das amostras não tenha influenciado a concentração de NUL.

A elevada correlação ( $r = 0,8018$ ) observada entre NU no leite e no lactossoro (Tabela 3) mostra que a fração de nitrogênio não protéico do leite encontra-se no soro, podendo assim, analisar a concentração de nitrogênio ureico tanto no leite como no lactossoro. No entanto, este resultado é diferente do observado por Eicher *et al.*<sup>6</sup> (1999) que relataram que após centrifugação, a concentração de NUL da amostra total de leite mostrou valores muito inferiores em relação às amostras de lactossoro correspondentes.

## Conclusão

Conclui-se que o nitrogênio ureico pode ser congelado por até 330 dias, podendo ser analisado tanto no leite integral como no lactossoro.

## Agradecimentos

À Universidade de Santo Amaro (Unisa) pelas Bolsas de Iniciação Científica fornecidas aos alunos e pelo auxílio financeiro.

## Referências

1. Arias J, Alonso AN. Importância dos níveis de nitrogênio uréico no leite e no sangue de vacas leiteiras. *Lat Am Anim Sci Meet.* 1997;73-84.
2. Baker LD, Ferguson JD, Chalupa W. Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *J Dairy Sci.* 1995;78:2424-34.
3. Broderick GA, Clayton MK. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J Dairy Sci.* 1997;80:2964-71.
4. Butler WR, Calaman JJ, Beam SW. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J Anim Sci.* 1996;74:858-65.

5. DePeters EJ, Cant JP. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *J Dairy Sci.* 1992;75:2043-70.
6. 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.* 1999;40:487-92.
7. Elrod CC, Butler WR. The relationship between blood and fertility parameters in postpartum dairy cows. *J Anim Sci.* 1993;71:694-701.
8. Faust MA, Kilmer LH. Determining variability of milk urea nitrogen reported by commercial testing laboratories. *Dairy Report: Iowa State University*; 1996.
9. Fernandez JM, Croom Jr WJ, Johnson AD, Jaquette RD, Edens FW. Sub-clinical ammonia toxicity in steers: effects on blood metabolite and regulatory hormone concentration. *J Anim Sci.* 1988;66:3259-69.
10. Franke AA, Bruhn JC, Lawrence CM. Distribution of protein in California milk in 1983. *J Dairy Sci.* 1988;71:2373.
11. Godden SM, Lissemore KD, Kelton DF, Leslie KE, Walton JS, Lumsdens JH. Factors associated with milk urea concentrations in Ontario dairy cows. *J Dairy Sci.* 2001;84:107-14.
12. Grings EE, Roffler RE, Deitelhoff DP. Response of dairy cows in early lactation to additions of cottonseed meal in alfalfa-based diets. *J Dairy Sci.* 1991;74:2580-90.
13. Gustafsson AH, Palmquist DL. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. *J Dairy Sci.* 1993;76:475-84.
14. Hinders R. MUN indicates adequacy of protein, carbohydrates in milking cow rations. *Feedstuffs.* 1996:11.
15. Lanben RC. Factors responsible for variation in milk composition. *J Dairy Sci.* 1963;46:1293-301.
16. Peixoto Jr KC. Nitrogênio ureico do leite como indicador de desempenho reprodutivo de rebanhos leiteiros [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2003.
17. Rook JAF. Variations in the chemical composition of the milk of the cow. Part 1. *Dairy Sci Abstrs.* 1961;23:251.
18. Ropstad E, Vik-Mo L, Refsdal AO. Levels of milk urea, plasma constituents and rumen liquid ammonia in relation to the feeding of dairy cows during early lactation. *Acta Vet Scand.* 1989;30:199-208.
19. SAS Institute. *SAS User's guide: statistics.* 5th ed. Cary, NC; 1985.

Recebido em 28/7/2009

Aceito em 21/9/2009