

## ÍNDICE

AGRICULTURA DE PRECISÃO: O PRIMEIRO ANO DE GESTÃO DA FERTILIDADE DO SOLO EM PASTAGENS J. M. SERRANO, J.O. PEÇA, P. PALMA, D. CRESPO, M. CARVALHO, J. R. SILVA, J. MENDES, J. ROMA e C. NOVAS .....	1
EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA E DA TECNOLOGIA DE FABRICO NA MICROFLORA DE CHOURIÇOS DE CARNE PORTUGUESES T. J.S. MATOS, A. S. F. H. BARRET <sup>1</sup> e F. M. A. BERNARDO .....	15
EFEITO DO AMBIENTE PRÉ-ORDENHA (SALA DE ESPERA) SOBRE A TEMPERATURA DA PELE, A TEMPERATURA RETAL E A PRODUÇÃO DE LEITE DE BOVINOS DA RAÇA JERSEY M.G. PINHEIRO, J.R. NOGUEIRA, M.L.P. LIMA, P.R. LEME, M. MACARI, A. NÄÄS, I.A. LALONI, L.C. ROMA JR., E.A. TITTO e A.F. PEREIRA.....	37
ESTUDO DAS PREFERÊNCIAS DOS CONSUMIDORES PORTUGUESES EM RELAÇÃO À COR DA CARNE DE PERU E TIPO DE EMBALAGEM UTILIZADA M.J. FRAQUEZA, A.S. CARDOSO, M.C. FERREIRA e A.S. BARRETO .....	45
ASPECTOS DA SEGURANÇA SANITÁRIA DOS ALIMENTOS COMPOSTOS PARA CAVALOS M. M. GUERRA H. M. MARTINS, M. F. GOUVEIA e F. BERNARDO.....	63
EFEITO DA CASTRAÇÃO E DA IDADE NAS CARACTERÍSTICAS DA CARNE DE BOVINOS PRODUZIDOS EM SISTEMA DE PASTOREIO C. G. MONTEIRO, D. NAVAS e J.P.C. LEMOS .....	77
ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DA PITUITÁRIA DE DOURADA ( <i>SPARUS AURATA</i> ): MARCADORES TIPO I PARA GENÉTICA MOLECULAR B.E.P. LOURO, A.L.S. PASSOS e D.M. POWER .....	99
CONSEQUÊNCIAS DA ELIMINAÇÃO DE REBANHOS PEQUENOS DA AVALIAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS LEITEIROS EM PORTUGAL J. VASCONCELOS, A. MARTINS, A. FERREIRA e J. CARVALHEIRA .....	105

## PRECISION FARMING: THE FIRST YEAR OF SOIL FERTILITY MANAGEMENT IN PERMANENT PASTURES

J. M. SERRANO\*, J.O. PEÇA, P. PALMA, D. CRESPO, M. CARVALHO,  
J. R. SILVA, J. MENDES, J. ROMA e C. NOVAS

Universidade de Évora, Departamento de Engenharia Rural,  
Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7002-554 Évora – Portugal  
E-mail: jmrs@uevora.pt

(Recepção: 30 de Julho de 2004; Aprovado: 29 de Novembro de 2004)

### ABSTRACT

Alto Alentejo is a southern province of Portugal with over 200,000ha under permanent pasture. It came natural for the mechanisation group of the University of Évora, localised in the region, to pursue the objective of demonstrating new technology for variable fertiliser application in permanent pastures. A three year project "Demonstration of technology for variable rate of seed and fertiliser application in grassland management" was established with the financial support from the Ministry of Agriculture, programme AGRO. This paper describes the following major steps required to accomplish the objective: -a commercially available, DGPS based, tractor mounted, precision farming package was used to interact with the electronic control system of the fertiliser spreader; - a backpack carried DGPS receiver with a hand-held recorder was used to draw the map of the field, to draw a sampling plan and to guide the operator to the sample location; -the results from soil physical properties, pH and nutrients analysis, as well as from the botanical components of the pasture were plotted onto the sample point map; - the maps were presented to agronomists for interpretation and a treatment plan was tailored to suit the pasture;- the application plan will be transferred to the tractor terminal and spreading will be done accordingly in the autumn of 2004. Fertiliser is put where it's needed. This has to be of benefit to the economy and to the environment.

**Key-words:** pastures, precision farming, variable fertiliser application

## AGRICULTURA DE PRECISÃO: O PRIMEIRO ANO DE GESTÃO DA FERTILIDADE DO SOLO EM PASTAGENS

### RESUMO

A importância das pastagens permanentes no Alto Alentejo, instaladas em cerca de 200.000 ha, justificam o desenvolvimento do projecto AGRO "Demonstração de tecnologias de aplicação diferenciada de fertilizantes e de sementes no melhoramento de pastagens no Alentejo". Neste foi possível reunir meios humanos e materiais capazes de levar a cabo a implementação do conceito genericamente designado

“Agricultura de Precisão”. No primeiro ano de projecto foram estabelecidas as ligações entre os diversos equipamentos e testado o seu funcionamento. Foi utilizado o sistema comercial “Fieldstar” como interface entre um receptor DGPS montado no tractor e o sistema de controlo electrónico do distribuidor. Com vista ao apoio à tomada de decisão em termos de aplicação diferenciada de fertilizante, foi levantada uma parcela de pastagem no que respeita às características topográficas, às propriedades físicas e químicas do solo e à composição florística da pastagem. Os mapas obtidos foram apresentados aos especialistas da equipa, os quais desenvolveram o respectivo plano de aplicação de fertilizante. Este, no Outono de 2004, será novamente transferido para o terminal “Fieldstar” por forma a comandar, no campo, o distribuidor centrífugo de adubo em função da posição geográfica da parcela e, por isso, das necessidades específicas de cada local. Os objectivos finais passam pela economia de factores de produção e pela redução do risco ambiental.

**Palavras-chave:** agricultura de precisão, fertilização diferenciada, pastagens

## INTRODUÇÃO

São conhecidos resultados da aplicação da gestão intra-parcelar em explorações agrícolas nos Estados Unidos desde a década de 80. Na Europa, a mesma tecnologia atingiu expressão semelhante na década seguinte. Em Portugal, vários investigadores demonstraram a intenção de participarem nesta dinâmica. Todavia, limitações que se prendem com o reduzido investimento nesta área associadas a questões estruturais não têm permitido ir além das intenções. Perspectiva-se, com o equipamento apresentado nesta comunicação, a possibilidade de passar definitivamente da teoria à prática.

A localização privilegiada da Universidade de Évora no contexto agrícola e a forte motivação da equipa de mecanização desta instituição, ao nível dos ensinos e da investigação, levaram ao envolvimento de um conjunto de agentes que incluem, para além desta instituição, empresas agrícolas ligadas à mecanização, às pastagens e à prestação de serviços, associações de agricultores, o Centro de Formação Profissional de Évora e a Direcção Regional de Agricultura do Alentejo, permitindo, desta forma, reunir os meios que possibilitam a aplicação diferenciada de fertilizantes, factores de produção com reconhecida importância económica e ambiental, e o principal encargo de manutenção das pastagens permanentes (Gillingham, 2001).

O interesse em transpor tecnologias de ponta, tradicionalmente utilizadas nos cereais, para a área das pastagens é um estímulo à pecuária extensiva e ao montado. No Alto Alentejo, uma grande percentagem de solos apresentam limitações à produção agrícola, uma vez que predominam parcelas caracterizadas por terem

uma reduzida camada arável, problemas de drenagem, baixos teores de matéria orgânica, elevada acidez e muitos afloramentos rochosos à superfície. Estas parcelas, durante muitas décadas submetidas à produção de cereais, atingiram um estado de degradação que inviabiliza a utilização de sistemas intensivos de produção. Exige-se agora a adopção de estratégias de recuperação a médio e longo prazo, as quais passam pela comprovada aptidão desta região do país para a produção pecuária de raças autóctones em regime extensivo, o que exige o fomento das pastagens permanentes, como parte integrante de um ecossistema de valor indiscutível que é o montado.

O gestor de uma pastagem tem consciência da variabilidade que ocorre, mesmo dentro de cada parcela, nas suas potencialidades produtivas e terá mesmo capacidade para sugerir a aplicação diferenciada de fertilizantes, correctivos e sementes, baseando-se na sua experiência e conhecimento técnico (Gillingham, 2001). A pastagem sob montado, característica do Alentejo, é um exemplo desta variabilidade. O que o gestor não tem normalmente são os meios para poder fazer a aplicação diferenciada dos factores de produção referidos, que a variabilidade lhe sugere, fazendo sim, com a tecnologia que dispõe, uma distribuição uniforme e não criteriosa, com impacto económico e ambiental. Porém, um círculo vicioso está instalado: a tecnologia não está divulgada porque o agricultor não a solicita; o agricultor não solicita a tecnologia porque a desconhece. Daí que os objectivos gerais deste projecto passem por experimentar a Tecnologia de Aplicação Diferenciada (TAD) na gestão de pastagens no Alentejo e, em face dos resultados e experiência adquiridos, demonstrar e divulgar esta tecnologia pela comunidade de agricultores, técnicos e prestadores de serviços.

### **EQUIPAMENTO UTILIZADO**

O equipamento reunido pelos participantes neste projecto, inclui:

- Tractor “Massey-Ferguson, 6130” (85CV), equipado com radar, parte integrante do sistema de informação “Datatronic 2”;
- Sistema “Fieldstar” para agricultura de precisão;
- Antena “DGPS Garmin 16” montada no tractor e estação “GPS Trimble 4700, RTK”, com 2 “rovers”;
- Distribuidor Centrífugo de Adubo “Vicon- RS-EDW” com sistema de comando e informação “Ferticontrol” e com células de carga instaladas na base da tremonha;
- Moto 4.

Para além deste equipamento, o projecto prevê a aquisição de um sistema “Lightbar”, de apoio à condução em linhas paralelas nas passagens sucessivas.

### **Equipamento de distribuição de adubo**

O equilíbrio entre as necessidades das culturas e a disponibilidade do solo é assegurado pelo fornecimento de nutrientes. A fertilidade do solo é, assim, mantida pelas diferentes formas de fertilização. O fornecimento ao solo de adubos sólidos granulados é normalmente assegurado pelos distribuidores centrífugos de adubo, cujo princípio assenta na utilização de um reservatório de adubo (tremonha), com capacidade variável, um sistema de alimentação e dosagem e um sistema de distribuição. O distribuidor centrífugo “Vicon RS-EDW” dispõe de uma tremonha com capacidade para 1500 L de adubo, a qual alimenta dois discos com rotação divergente.

O distribuidor permite um conjunto de regulações mecânicas com o duplo objectivo de ajustar o débito de adubo e regular a largura de trabalho. A densidade de adubo distribuída (D) é expressa em massa (kg) por unidade de área (ha) e pode ser calculada a partir da equação

$$D = \frac{q \times 600}{l \times v} \quad (1)$$

sendo: q= caudal (kg/minuto); l= largura de trabalho (m); v= velocidade de trabalho (km/h); 600= factor de conversão de unidades.

No distribuidor “Vicon RS-EDW” é possível a regulação automática da densidade de aplicação pretendida em função da velocidade de avanço (figura 1). Estes distribuidores são designados distribuidores com débito proporcional ao avanço (DPA). O operador, através de uma consola, programa um microprocessador com a densidade de distribuição pretendida e com a largura de trabalho do distribuidor (Fig. 2). O microprocessador recebe também a informação da velocidade de trabalho, neste caso proveniente de um radar instalado no tractor. No distribuidor “Vicon RS-EDW”, a integração de um sistema de pesagem, que inclui 5 sensores de massa colocados na base da tremonha, permite medir a massa de adubo existente na tremonha de meio em meio segundo, logo o caudal de massa instantâneo do distribuidor. Esta informação é fundamental para a regulação da densidade de aplicação de adubo pretendida, de acordo com a equação (1).

A regulação automática da densidade de distribuição pretendida é conseguida pela ligação do microprocessador a um actuador eléctrico, o qual ajusta

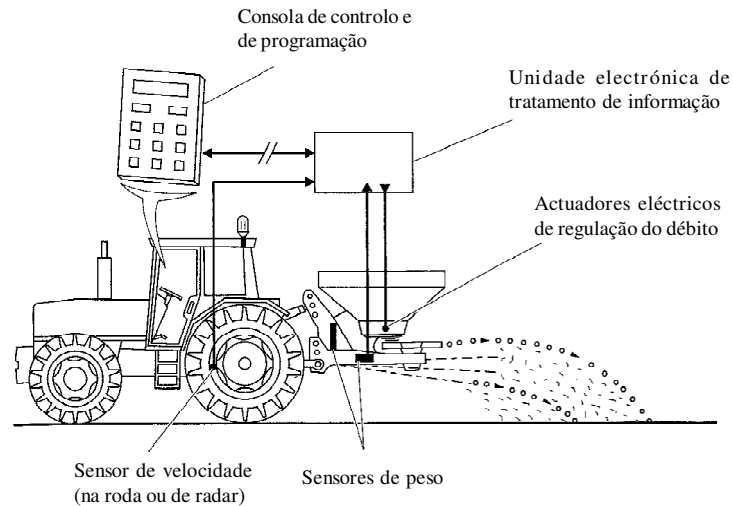


Figura 1. Princípio de regulação do débito proporcional à velocidade de avanço, sistema DPA (Cemagref, 1997).

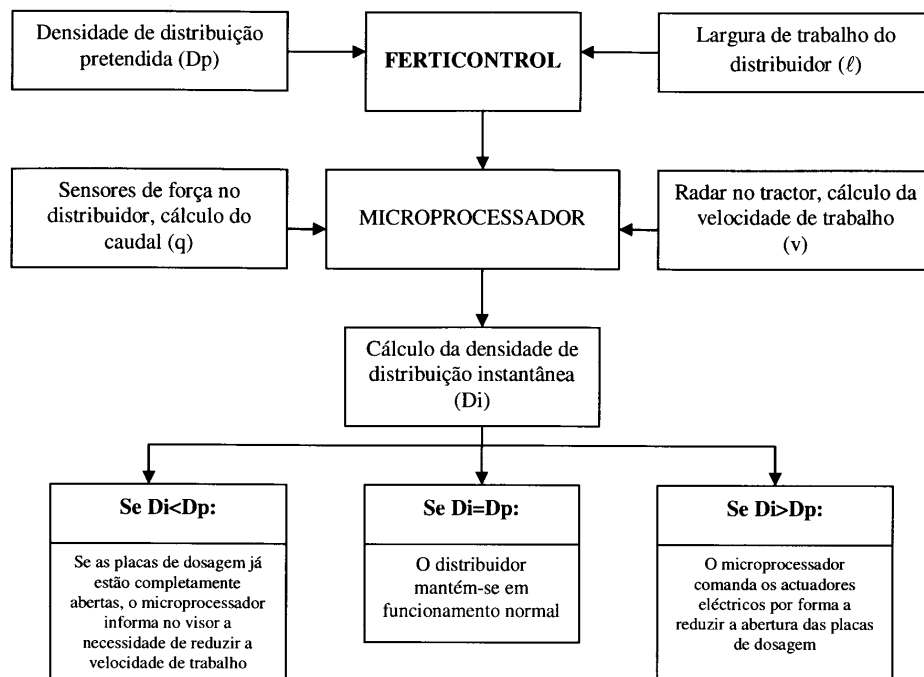


Figura 2. Diagrama representativo da regulação da densidade de distribuição pelo sistema "Ferticontrol".

a abertura das placas de dosagem, ou seja, ajusta o caudal de massa de adubo em função da velocidade de avanço.

O microprocessador pode, inclusivamente, apresentar funções de informação ao operador, por exemplo, indicando-lhe a velocidade de avanço, a distância ou a área trabalhada, a quantidade de adubo distribuída, podendo mesmo informar que deve seleccionar uma menor velocidade de avanço para garantir a densidade de aplicação pretendida, sempre que as placas de dosagem se encontrem completamente abertas.

### **Sistema de localização do tractor no terreno**

A implementação do conceito de agricultura de precisão exige a ligação dos equipamentos agrícolas (tractores, alfaías, ceifeiras, ...) a sistemas de localização de máquinas no terreno. Desta forma, as informações recolhidas pelos sensores electrónicos são geo-referenciadas, permitindo ao agricultor voltar à parcela e identificar os factores responsáveis por comportamentos pouco vulgares das variáveis em estudo.

O tractor de ensaio encontra-se equipado com uma antena GPS "Garmin 16". O sistema GPS ("Global Positioning System") é o principal sistema de localização de máquinas no terreno e consiste na utilização sobre os equipamentos agrícolas de um receptor de ondas, enviadas por uma rede de 24 satélites em órbita em volta da terra. O cálculo das coordenadas assenta no conhecimento da posição dos satélites e na determinação da distância receptor-satélites a partir do tempo de propagação dos sinais entre os satélites e o receptor. O receptor calcula as suas coordenadas por trilateração (procura do ponto de intersecção das esferas centradas sobre os satélites). É necessário o receptor captar sinais de 3 satélites para que possa calcular a longitude e a latitude; a altitude é calculada com um satélite suplementar (Zwaenepoel e Bars, 1997). O cálculo das distâncias entre o receptor e os satélites baseia-se na determinação do tempo de propagação da onda e na velocidade de propagação da mesma (aproximadamente, a velocidade da luz). Estes sistemas têm associado um erro que, consoante as circunstâncias, pode ir de algumas dezenas de metros até cerca de uma centena de metros. Para melhorar a precisão do sistema, até valores sub-métricos, tornando-o compatível com a agricultura de precisão, o receptor em causa tem acesso a um sinal de correcção enviado por uma estação de referência, neste caso um satélite geo-estacionário, funcionando o receptor com correcção diferencial (DGPS).

A equipa do projecto dispõe ainda de uma antena "Trimble 4700", constituída por uma base e por dois "rovers". A base é instalada num local de coordenadas

conhecidas, procedendo à correcção em tempo real (RTK) das coordenadas registadas pelos “rovers”, os quais poderão ser transportados no próprio tractor, numa moto 4 ou mesmo pelo próprio operador.

## APLICAÇÃO DA AGRICULTURA DE PRECISÃO ÀS PASTAGENS

### Ligação e teste dos diferentes equipamentos

Qualquer projecto que envolva novas tecnologias de diferentes fabricantes, apresenta sempre como principal dificuldade a de estabelecer as ligações entre os diferentes equipamentos. A Organização Internacional de Normalização (ISO, International Organization for Standardization) tem desenvolvido actividade com vista ao estabelecimento de normas que permitam as ligações entre diferentes equipamentos electrónicos. Por exemplo, a norma 11783 define a linha de comunicação para as trocas de informação entre os equipamentos móveis, tractores e alfaias (Zwaenepoel e Bars, 1997). A questão da dificuldade de ligações é reforçada quando os representantes da tecnologia em Portugal vendem um número reduzido de exemplares, não encontrando aqui justificação para o investimento na formação dos seus quadros. Este projecto e estes equipamentos não fogem à regra, sendo que a primeira fase deste projecto consistiu no estabelecimento da ligação de todo o sistema, esquematicamente ilustrado na Fig. 3.

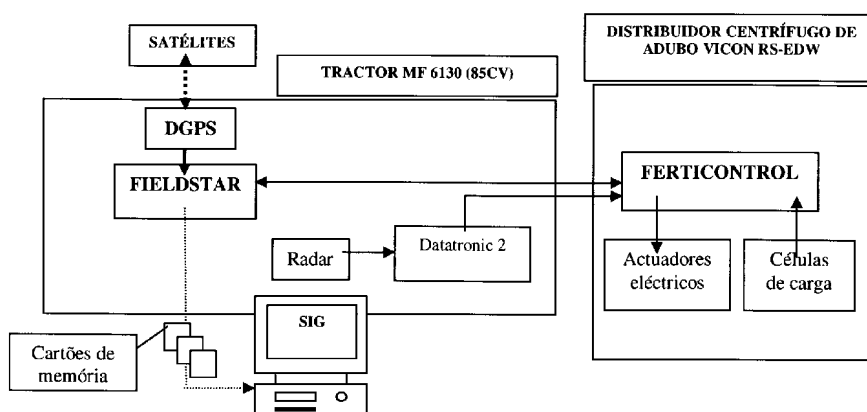


Figura 3. Diagrama esquemático do sistema de aplicação diferenciada de fertilizantes.

O sistema comercial “Fieldstar” foi desenvolvido pela Massey-Ferguson, permitindo, no caso em estudo, interligar a informação do tractor (radar), da alfaia



(através do sistema de controlo “Ferticontrol”) e dos satélites (DGPS). O operador apenas terá que programar no “software” do computador de bancada um cartão de memória, onde insere no mapa da parcela as densidades de adubo a aplicar em cada zona da mesma.

Previamente à realização dos ensaios de campo, foi testado o distribuidor centrífugo de adubo em duas etapas. Na primeira, foi desenvolvido um depósito de recolha de adubo que permitiu avaliar a capacidade de ambos os discos do distribuidor para fornecer um caudal de adubo que garantisse a densidade de aplicação programada, em função da velocidade de avanço. Na segunda, foi avaliada a uniformidade lateral de distribuição do distribuidor centrífugo de adubo e estabelecida a largura de trabalho do distribuidor para o adubo a aplicar. Esta operação foi efectuada colocando lateralmente à passagem do tractor um conjunto de recipientes para ensaios em branco, onde foi recolhido o fertilizante distribuído e determinada a sua massa, permitindo o estabelecimento da curva de distribuição respectiva.

Também antes da realização dos ensaios de campo, foi testada a precisão do sistema “DGPS Garmin” instalado no tractor. A precisão foi testada em 4 pontos notáveis, onde em dias diferentes e várias vezes ao dia foram efectuadas leituras das coordenadas geográficas, tendo-se verificado um raio de dispersão da ordem dos 3 a 5 m.

### **Levantamento de uma parcela de pastagem**

O conceito de agricultura de precisão reagrupa um conjunto de técnicas destinadas a implementar as práticas agrícolas em função dos objectivos económicos mas tendo igualmente em conta as preocupações ambientais. A adaptação das operações culturais e, em particular, os fornecimentos de fertilizantes, assenta no conhecimento das heterogeneidades agronómicas do solo e das plantas, o que exige uma fase prévia de caracterização da parcela (Douzals, 2000).

A primeira etapa de qualquer ciclo de agricultura de precisão passa, por isso, pela avaliação da heterogeneidade das parcelas. Quantificar a variabilidade inerente ao meio natural é essencial para decidir sobre a estratégia a implementar na condução das culturas, sobre o interesse ou não de gerir uma parcela de forma diferenciada (Zwaenepoel e Bars, 1997).

O processo de levantamento levado a cabo na parcela de ensaio visou a construção de mapas de caracterização no ano zero, antes da intervenção da

tecnologia de aplicação diferenciada. O tractor Massey-Ferguson 6130, equipado com o sistema “Fieldstar” e guiado pela antena “DGPS-Garmin” foi conduzido ao longo dos extremos de uma parcela de pastagem instalada na Herdade da Revilheira (da Direcção Regional de Agricultura do Alentejo), em Reguengos de Monsaraz. Com o seu sistema de localização, foram registados no cartão de memória pontos de referência do contorno e a presença de árvores, afloramentos rochosos e outros obstáculos naturais existentes. Os dados foram transferidos através de um cartão de memória, para um computador pessoal (PC) equipado com “software” adequado, o qual mostra o contorno da parcela e identifica os obstáculos registados. Criou-se desta forma o mapa da parcela. O mesmo contorno foi efectuado com o “DGPS-Trimble”, tendo instalado o “rover” sobre uma moto 4. Este equipamento permitiu o levantamento topográfico da parcela, após tratamento de dados no programa de Topografia “Autodesk Land Desktop”.

Com base na largura de trabalho do distribuidor, foram geo-referenciados pontos da grelha de levantamento da parcela e criado um plano de amostras.

A análise de terra é o método mais antigo, mas também o mais seguro, de caracterizar um solo agrícola (Douzals, 2000). Foram, por isso, recolhidas amostras geo-referenciadas para avaliação de composição física (granulometria) e química do solo (azoto total; fósforo e potássio extraíveis; pH e matéria orgânica). O campo experimental foi subdividido numa malha de 28m\*28m, tendo sido obtida uma amostra compósita em cada quadrícula resultante de 3 recolhas de amostras de solo, a 20 cm de profundidade.

Por outro lado, e uma vez que a avaliação da produção é incontornavelmente o único método de comprovação da heterogeneidade das parcelas que tem em conta o resultado final da cultura (Berducat e Boffety, 2000), procedeu-se também à recolha de amostras geo-referenciadas de pastagem com vista à análise da composição florística (relação entre gramíneas e leguminosas, produção de matéria seca, etc.). As amostras recolhidas foram tratadas nos Laboratórios de Física e de Química de Solos e de Pastagens e Tecnologia de Forragens da Universidade de Évora.

A Fig. 4 ilustra, à esquerda, o mapa de distribuição de fósforo extraível na parcela e, à direita, a produção de matéria seca total na parcela.

Com os resultados das análises e das observações será então possível construir o mapa da capacidade produtiva do solo ou mapa da variação do potencial produtivo do solo, o qual servirá para o gestor tomar decisões no que respeita à aplicação dos factores necessários à instalação e manutenção da pastagem.

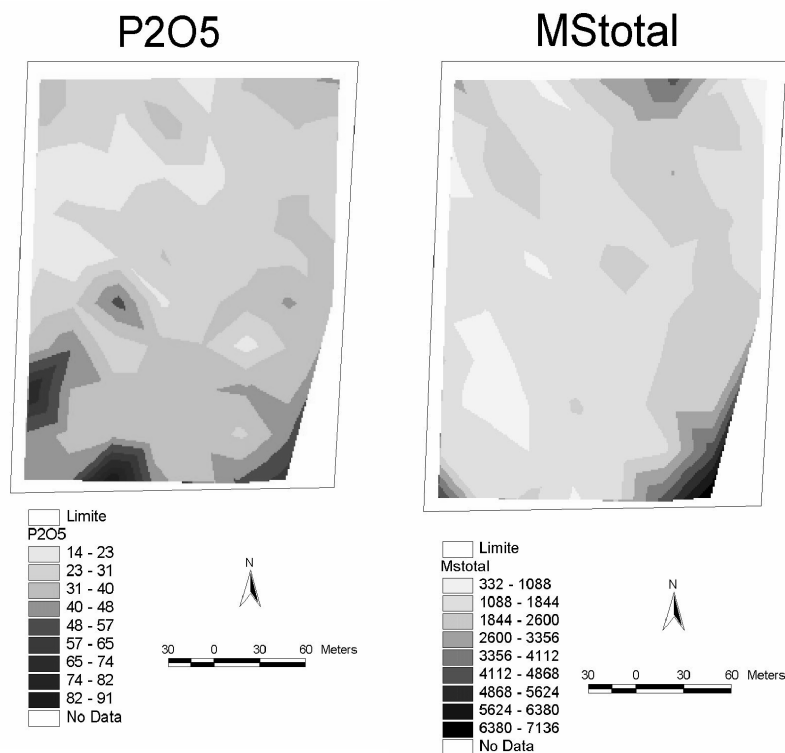


Figura 4. À esquerda, mapa de distribuição do fósforo na parcela (em p.p.m.); à direita, mapa de produção de matéria seca (em kg/ha).

### Aplicação diferenciada de fertilizantes

As informações recolhidas (características topográficas; aspectos físicos e químicos do solo; composição florística da pastagem) serão agora disponibilizadas aos especialistas da equipa e a consultores externos para efeitos de tomada de decisão no que respeita à aplicação dos factores necessários à instalação e manutenção da pastagem.

Esta é, seguramente, a fase mais complexa de todo o ciclo de agricultura de precisão. Segundo Zwaenepoel e Bars (1997), a elaboração de sistemas de apoio à tomada de decisão agronómica adaptados à agricultura de precisão, para interpretação dos mapas de capacidade produtiva dos solos, susceptíveis de tomar em conta os objectivos específicos de cada exploração, combinando na decisão final os critérios económicos, ambientais e de qualidade da produção, vai exigir

um esforço muito importante nos próximos anos, nomeadamente para a produção de referências regionais e locais.

Sobre o mapa da parcela, o programa “Fieldstar” introduz uma grelha que o divide em sub-parcelas com largura igual à largura de trabalho. Em cada uma destas sub-parcelas, e com base no mapa de caracterização anteriormente indicado, será feito o registo das quantidades de fertilizantes a aplicar. Cria-se, desta forma, o mapa de tratamentos (ou mapa de aplicação de sementes e fertilizantes).

Uma vez tomada a decisão que permitirá estabelecer o programa de tratamentos, o mapa será transferido para um cartão de memória, o qual será introduzido no terminal “Fieldstar” do tractor, garantindo que as desejadas densidades de distribuição sejam aplicadas, automaticamente, no local previamente estabelecido e em função das suas necessidades.

É prática comum na parcela agora considerada para ensaio, a distribuição do adubo superfosfato 18% de forma homogénea em toda a parcela. Quelhas dos Santos (1976) refere a importância do fósforo para aumentar a proporção de leguminosas numa consociação, potencializando a fixação do azoto e, portanto, promovendo o desenvolvimento das gramíneas. Contribui-se, assim, para um melhor equilíbrio entre estas espécies e para um maior valor nutritivo da pastagem. Gillingham (2001) refere, também, a produtividade das pastagens na Nova Zelândia largamente dependente da aplicação de Superfosfato. Neste primeiro ano de ensaio, manter-se-á a aplicação deste adubo, embora de forma diferenciada, de acordo com o levantamento efectuado ao nível do solo e da pastagem.

A gestão intra-parcelar é um processo em que o nível de conhecimento é cumulativo. São necessários vários anos de observações para identificar os principais factores explicativos da variabilidade constatada (Zwaenepoel e Bars, 1997). Os sistemas de informação geográfica são uma ferramenta fundamental, uma vez que permitem armazenar e sobrepor diferentes camadas de informação, do mesmo parâmetro e de vários anos ou de vários parâmetros em simultâneo, as quais facilitam a análise e a tomada de decisão do gestor da exploração.

A Fig. 5 ilustra o ciclo completo de gestão diferenciada em parcelas de pastagens. O sistema “Fieldstar” será utilizado para registar a evolução que o tratamento diferenciado proporcionou, criando-se desta forma uma actualização do potencial produtivo do solo.

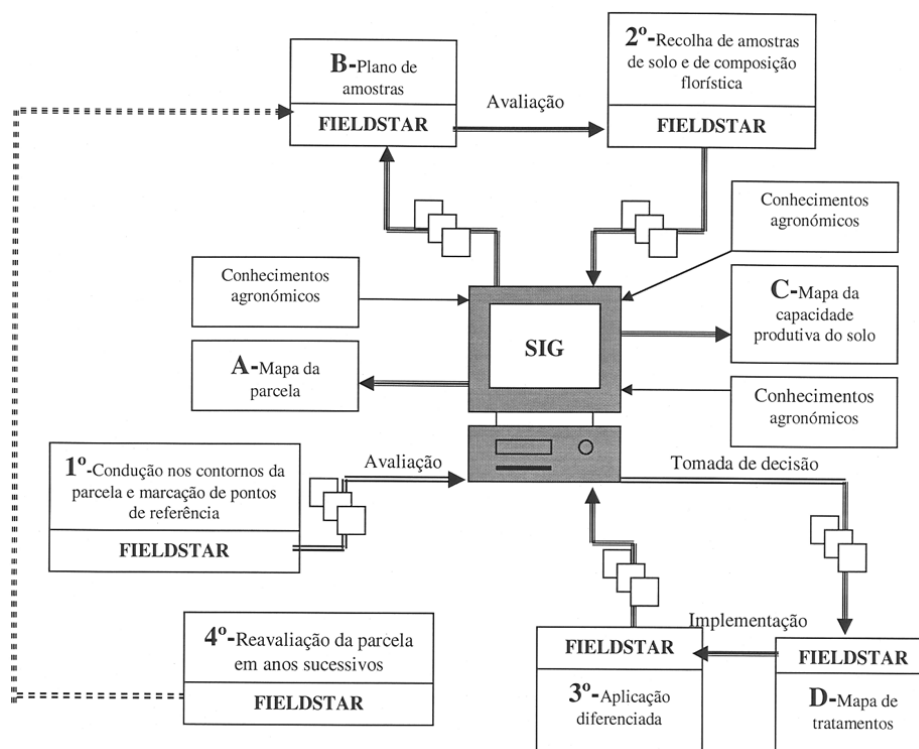


Figura 5. Ciclo de gestão diferenciada de pastagens.

## NOVAS PERSPECTIVAS

O conceito de gestão intra-parcelar foi desenvolvido para os cereais, com a adaptação de sensores para medição da massa de grão colhido pelas ceifeiras debulhadoras e a elaboração dos designados mapas de produtividade da cultura, primeiro instrumento de avaliação da heterogeneidade das parcelas. Alguns fabricantes de maquinaria agrícola desenvolvem já sensores para medição da massa de forragem nos corta-forragens, perspectivando um novo campo de aplicação da agricultura de precisão (Berducat e Boffety, 2000).

Outros destinos naturais desta tecnologia são as culturas regadas, nomeadamente a gestão dos perímetros de rega, e as culturas mediterrâneas, com grande importância económica em Portugal, como são a vinha e o olival.

No que se refere às necessidades de novos sensores sobre as máquinas de recolha, para além da melhoria da pertinência das informações do rendimento

de produção, a preocupação incide agora na qualidade dos produtos recolhidos (Berducat e Boffety, 2000). Stafford (1999) introduz o interesse de, antes da colheita, dispor de uma carta de qualidade, por forma a recolher separadamente as diferentes zonas da parcela. O mesmo autor refere, inclusivamente, a possibilidade de utilizar um sensor na ceifeira debulhadora para medição em tempo real da taxa de proteína do grão e proceder automaticamente à separação em tremonhas diferentes em função da qualidade do grão.

Ainda no âmbito da aplicação diferenciada de fertilizantes, a evolução passará pela colocação de várias tremonhas com diferentes adubos (ou sementes) e um misturador comandado pelo sistema de localização na parcela. Em função das informações da cartografia, o sistema mistura os diferentes elementos (N, P, K ou sementes), por forma a respeitar a dosagem adequada às necessidades de cada superfície a fertilizar ou a semear (Cemagref, 1997; Zwaenepoel e Bars, 1997). Este será um sistema em tudo idêntico ao utilizado, por exemplo, nos misturadores de rações para animais.

A evolução tecnológica proporciona actualmente um grande volume de informação e cria ao gestor um grau de dificuldade acrescido. Exige-se agora o correspondente desenvolvimento ao nível das ferramentas de apoio à tomada de decisão. É dada particular importância ao levantamento expedito das parcelas, surgindo a determinação da condutividade eléctrica do solo como um dos parâmetros de eleição das equipas de investigação em todo o mundo, como resultado da comprovada ligação entre este parâmetro e as características químicas do solo. Sensores de esforço nos modernos tractores agrícolas são outra forma de revelar a variabilidade das características do solo a partir da medição do esforço de tracção solicitado por alfaias de mobilização do solo, permitindo a identificação de zonas problemáticas nas parcelas (Douzals, 2000).

### **NOVAS TECNOLOGIAS: UMA ESTRATÉGIA ATRACTIVA**

Todos reconhecem o custo elevado destas tecnologias, pelo que se exige o estabelecimento de parcerias que permitam diluir os encargos e rentabilizar as potencialidades inerentes. O envolvimento nesta equipa de investigação de agentes com interesses multidisciplinares, incluindo uma Universidade, um centro de formação profissional, um fabricante de tractores agrícolas, um prestador de serviços, uma Direcção Regional de Agricultura e vários agricultores constitui um exemplo da estratégia a seguir neste e noutros domínios em que Portugal continua na retaguarda.

As tecnologias inovadoras permitem dar uma contribuição no sentido de mostrar que a agricultura tem hoje ao seu dispor meios que são suficientemente atractivos para que esta possa competir de igual para igual com outras áreas de opção. Este aspecto é particularmente importante quando é notório o contínuo abandono da agricultura como área de escolha de estudo por parte dos jovens, nomeadamente por razões que se prendem com a falta de sofisticação, relativamente ao ensino de outras áreas técnicas (de engenharia e outras). Por outro lado, não sendo hoje o ensino e os serviços do estado saídas profissionais para os licenciados na área da agricultura e não podendo a estrutura agrícola absorvê-los, há que fomentar o auto-emprego. A prestação de serviços na agricultura, nomeadamente com as novas tecnologias como as que o projecto pretende demonstrar, será uma possibilidade, como já o é em muitos países da Europa.

#### **AGRADECIMENTOS**

Ao INIAP pelo financiamento do projecto "Demonstração de tecnologias de aplicação diferenciada de fertilizantes e de sementes no melhoramento de pastagens no Alentejo" no âmbito do programa AGRO.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- BERDUCAT, M. e BOFFETY, D., 2000. Gestion de l'information parcellaire – cartographie du rendement à la récolte. Ingénieries, EAT, Nº 24, Décembre, pp. 53-62.
- CEMAGREF, 1997. Les matériels de fertilisation et traitement des cultures. Technologies de l'agriculture, Collection Formagri, p. 343.
- DOUZALS, J., 2000. Mesures physiques de la variabilité des sols en agriculture de précision. Ingénieries, EAT, Nº 24, Décembre, pp. 45-52.
- GILLINGHAM, A., 2001. Precision Management of Fertiliser Application to Pasture. First Australian Geospatial Information and Agriculture Conference, Sydney, Australia, pp. 534-541.
- QUELHAS DOS SANTOS, J., 1976. Aspectos Gerais da Fertilização. 2ª Edição, Ampor, Amoníaco Português-S.A.R.L., Lisboa, p. 168.
- STAFFORD, J.V., 1999. An investigation into the within-field spatial variability of grain quality. 2<sup>nd</sup> European Conference on Precision Agriculture, pp. 353-359.
- ZWAENEPOEL, P. e BARS, J., 1997. L'agriculture de précision. Ingénieries, EAT, Nº 12, Décembre, pp. 67-79.

## EFFECT OF SHELF LIFE PERIOD IN MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGE AND OF PROCESSING TECHNOLOGY ON MICROFLORA OF PORTUGUESE SMOKED DRY SAUSAGES

T. J.S. MATOS<sup>\*1</sup>, A. S. F. H. BARRETO<sup>1</sup> e F. M. A. BERNARDO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária, CIISA, UTL, R. Prof. Cid dos Santos - Polo Universitário, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal \*Corresponding author: Rua Rua da Costa nº 60, 1ºDtº, 1350-111 Lisboa; E-mail: [matosteresa@isa.utl.pt](mailto:matosteresa@isa.utl.pt)

(Recepção: 20 de Novembro de 2004; Aprovado: 20 de Fevereiro de 2005)

### ABSTRACT

The mainly goals of this work were to study the effect of shelf life period (120 days at 20±5 °C in modified atmosphere package, MAP - 55% N<sub>2</sub>/45% CO<sub>2</sub>) and of the processing technology in the microbial flora of two types of Portuguese smoked dry sausage (chouriço type Alentejano and Ribatejano). Results obtained indicated that lactic acid bacteria (LAB), sporeformer bacteria, total mesophilic bacteria and staphylococci constituted the predominant flora in both types of product and in both periods studied (in the beginning and at the end of shelf life period). Search analyses revealed that the predominant group was enterococci in both types of product and in both periods studied. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, coliforms and *Escherichia coli*, were not detected in any of the samples analysed. Sulphite reducing clostridia search analysis revealed that only six samples (50% of prevalence), in the end of shelf life period, were not in accordance to the bacteriological standard for Portuguese food. Microbial population, in both types of product, was significantly affected by shelf life period in MAP at 20±5 °C. For product type Ribatejano, shelf life promoted a significant decrease (P<0.05) in total counts of all groups of micro-organisms with exception in fungi and, for chouriço type Alentejano, significant decreasing values were obtained for LAB, sporeformer bacteria and total mesophilic counts. Therefore, shelf life of modified atmosphere packed Portuguese chouriço, should preferably be defined by unacceptable appearance (drip loss, colour change) rather than a certain maximum acceptable microbial level.

**Key-words:** Microflora, processing technology, portuguese "chouriço", modified atmosphere package, shelf life



## **EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA E DA TECNOLOGIA DE FABRICO NA MICROFLORA DE CHOURIÇOS DE CARNE PORTUGUESES**

### **RESUMO**

Constituíram objectivos deste trabalho o estudo do efeito do prazo de validade (120 dias a  $20\pm 5^\circ\text{C}$  em atmosfera modificada, ATM - 55%  $\text{N}_2$ /45%  $\text{CO}_2$ ) e da tecnologia de fabrico na flora microbiana de dois tipos de chouriço de carne português (chouriço tipo Alentejano (A) e tipo Ribatejano (R)). As bactérias lácticas, as bactérias formadoras de esporos, os microrganismos aeróbios mesófilos totais e os estafilococos, constituíram a flora microbiana dominante nos chouriços do tipo A e do tipo R. Os enterococos constituíram-se como o principal grupo microbiano detectado pelas análises de pesquisa. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, coliforms e *Escherichia coli*, não foram detectados. Estes resultados foram constatados quer no início, quer no final do prazo de validade. Os microrganismos do tipo clostrídios sulfito-redutores, foram detectados no total das amostras analisadas no final do prazo de validade, constituindo este resultado uma alteração aos padrões bacteriológicos tidos como normais. A população microbiana foi significativamente afectada pelo prazo de validade em ATM a  $20\pm 5^\circ\text{C}$ . No produto tipo Ribatejano o prazo de validade promoveu um decréscimo significativo ( $P<0.05$ ) nas contagens de todosos grupos microbianos estudados exceptuando-se o grupo dos fungos e, no chouriço tipo Alentejano, valores significativamente inferiores foram obtidos nos grupos das bactérias lácticas, bactérias esporuladas e microrganismos aeróbios mesófilos totais. Desta forma, aconselha-se que o prazo de validade deste tipo de produtos embalados em ATM, seja preferencialmente definido pelo aparecimento de características impeditivas à sua comercialização (perda de água, alteração de cor) ao invés de se estabelecer níveis máximos admissíveis de contagens microbianas.

**Palavras-chave:** Atmosfera modificada, chouriço português, prazo de validade, tecnologia de fabrico

### **INTRODUCTION**

The portuguese smoked dry sausage “chouriço” is a very typical product and the characteristic flavour, nutritional value, long shelf life period and easy industrialisation make it a very well accepted and consumed product in Portugal. The originality of this product is the drastic processing and the intensively smoking by direct fire from hard wood (especially cork tree and holm oak) (Sousa and Ribeiro, 1983). Smoke flavourings, such as aldehydes, aliphatic acids and phenolic compounds, besides the contributions of flavour and colour, also contribute to the

foregoing quality (shelf life) of processed meats and are effective antibacterial and anti-fungal agents (Wendorff, 1981; Hollenbech, 1994).

In the Portuguese meat industry, maturation period takes one to three days, where meat and formulation ingredients stand at temperatures below 10 °C. This technological phase is very important to achieve the typical final product. Salt, water and micro-organisms play an important role during the maturation process. The salt when penetrating in the meat fragments, besides extracting water and protein from muscle fibres, also inhibit bacteria growth, which demands high water activity and, the microbial flora that will grow under these conditions are salt tolerant (Sousa and Ribeiro, 1983). Lactic acid bacteria constitute the predominant flora during the ripening process and prevailing the final product (Rosselló *et al.*, 1995) indicating a well-optimised fermentation process which promotes the growth of these bacteria (Demeyer *et al.*, 1986; Samelis *et al.*, 1998). Enterococci occur and may compete well in fermented sausages (Holley *et al.*, 1988a,b); Marchenisi *et al.*, 1992; Papa *et al.*, 1995; Devriese *et al.* (1995) and Hugas *et al.* (2003) and reported that, among LAB species, *E. faecium* and *E. faecalis*, but specially *E. faecium* represent one of the LAB species that can be found in relatively high numbers during meat fermentation in fermented sausages. Considerations about their significance vary as enterococci may enhance sausage aroma and taste by their proteolytic activities, but may also compromise safety if opportunistic pathogenic strains proliferate (Holley *et al.*, 1988b). Several studies (Daporta Padín, 1988; Daporta Padín, 1988; Encinas *et al.*, 1996; te Giffel *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 1998; García-Varona *et al.*, 2000; Cocolin *et al.*, 2001; Hugas *et al.*, 2003; Papamanoli *et al.*, 2003) were conducted to identify the bacterial populations on fermented dry sausages. Encinas *et al.* (1996) in spanish fermented sausages during the manufacture and ripening founded high numbers of *Bacillus* during fermentation and, these authors considered *Bacillus* the second most important bacterial group after lactic acid bacteria. Also te Giffel *et al.* (1996) showed the high prevalence of *Bacillus* species in meat products compared with raw meat (Kramer and Gilbert, 1989; Konuma *et al.*, 1988) confirming the role played by meat additives as a source of contamination of these species. García-Varona *et al.* (2000), in different varieties of spanish chorizo, and Cocolin *et al.* (2001), in naturally fermented italian sausages, founded high numbers of *Micrococcaceae* species involved in fermented sausage production as *Staphylococcus xylosus*. Daporta Padín (1988) and García-Varona *et al.* (2000) also identified species of *Micrococcaceae* in chorizo.

Microbial growth in foods is controlled by intrinsic factors such as nutrient availability, pH, redox potential, water activity ( $a_w$ ) and antimicrobial constituents,

and extrinsic factors such as storage temperature and oxygen availability (Jay, 2000). With the purpose of extending shelf life there are various methods of modified atmosphere packaging that are used to alter the gaseous environment on and around foods. Three basic requirements are requested for successful application of MAP to meat products: the gas or gases surrounding the product must contain at least 20% (v/v) CO<sub>2</sub> (compared to the normal 0.03% found in air), the product and modified atmosphere (MA) must be contained in a package, which prevents or inhibits the exchange of the gases with the exterior environment and, the storage temperature must be controlled to insure the effectiveness of the gas mixture at controlling microbial growth. Among CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> gases, CO<sub>2</sub> is the most important because it is the inhibitoriest to the growth of spoilage micro-organisms (Hotchkiss & Langston, 1995). Depending on the initial quality of the product, storage temperature, and package construction and design, shelf life can be extend by two- to four-fold with MAP. Generally, higher amounts of initial CO<sub>2</sub> give longer shelf life however, the effectiveness of CO<sub>2</sub> as a bacteriostatic is dependent on its solubility in the aqueous portion of the food. As the storage temperature increases, solubility and thus ability of the gas to inhibit growth decreases. For this reason, MA containing elevated concentrations of CO<sub>2</sub> are more effective at low temperatures (Carr and Marchello, 1986). Other factor that influenced the effectiveness of MAP is the ability of the package to contain the MA. Gases used in MAP permeate all common food packaging film by diffusion and so the shelf life is directly affected by the rate of diffusion. However, the cost of the films increases with increasing barrier (Robertson, 1993). Thus, a trade off in shelf life versus cost must be made. The total amount, rather than concentration of CO<sub>2</sub> relative to the mass of food in a package, the length of time the gas is in contact with the food, the condition of the product when the CO<sub>2</sub> is applied, and the storage temperature all contribute to the effectiveness of the MA (Hotchkiss, 1989).

Furthermore investigation concerned with the effect of different combinations of CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> in cured, dry meat products has to be developed. Only with this data is it possible to determine the optimum concentration of CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> to extend shelf life period with safety.

The aim of this research was to study the effect of the processing technology of two types of Portuguese dry smoked sausages (chouriço Alentejano and Ribatejano) and of the shelf life period (120 days at 20±5 °C) in modified atmosphere package (55% N<sub>2</sub> 45% CO<sub>2</sub>) in some groups of micro-organisms. Results were analysed regarding sanitary and technological aspects of these meat products.

## MATERIALS AND METHODS

### Processing technology

Two types of Portuguese smoked dry sausage, which contained 38% of fat, 34% of moisture and about 21% of protein, were studied immediately after thermal processing and after producer-defined shelf life period in modified atmosphere package. These “chouriço” contained pork, red pepper paste, water, salt, garlic paste, olive oil, spices, sugar, liquid smoke, additives (sodium nitrite, E250 and commercial sausage sodium polyphosphate, E452(i)) for type “Alentejano” (A), and pork, red pepper paste, water, salt, garlic paste, spices, white wine, sugar, liquid smoke, additives (sodium nitrite, E250 and commercial sausage sodium polyphosphate, E452(i)) for type “Ribatejano” (R), as showed in Table I.

TABLE I - COMPOSITION OF ALENTEJANO AND RIBATEJANO SMOKED DRY SAUSAGES.

Formulation (g/kg)	<i>Chouriço Alentejano</i>	<i>Chouriço Ribatejano</i>
<b>Meat raw material</b>		
- Pork belly boneless, without rind	172.1	176.0
- Pork picnic, boneless, without shank	688.2	528.1
- Pork trimming 90/10	-	176.0
Sub-total	860.3	880.1
<b>Ingredients</b>		
- Commercial sausage sodium polyphosphate, E452(i); (50% of P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	5.0	5.0
- Water	31.0	12.7
- Sugar	2.1	2.1
- Olive oil	5.2	-
- Liquid smoke	1.0	1.4
- Spice louter	0.02	0.04
- Sweet chilli	-	5.0
- Powder clove	-	0.1
- Garlic paste	11.0	11.3
- Sweet red pepper paste	4.3	8.8
- Special red pepper paste	44.9	46.1
- Hot red pepper paste	12.9	2.5
- White pepper (powder)	1.7	1.1
- Sodium chloride with sodium nitrite, E250, (0.6% of NaNO <sub>2</sub> )	10.3	10.0
- Salt	10.3	10.0
- White wine	-	3.9
Sub-total	139.7	119.9
Total	1000	1000

Major differences in these two products were observed in olive oil, spices, hot red pepper paste and in white wine, besides the casings used. Meat is minced in pieces at a cut of 15 mm (pork picnic, boneless, without shank) and 7.5 mm (pork belly boneless, without rind) for “chouriço” type A and to 20 mm for all meat material in “chouriço” type R. The mixture of the meat with the other formulation components was accomplished in a vacuum mixer with rotative vat and arms with format in z and with two rotations. The complete meat, spice and curing ingredients formulation were held at 0 to 5 °C in a refrigerator cabinet for 1 day (maturation period).

Casings used for these sausages were natural. A natural pork salted casing was used for “chouriço Ribatejano”, and a beef dry intestine for “chouriço Alentejano”. This operation was carried out by use of filler stuffer vacuum equipment with automatic volume programme and hydraulic driving. Type A weighed about 380 g and type R 370 g (mean value) after stuffed into casings. The casings were hand closed with cotton string.

Thermal processing was divided in two phases. First phase was conducted at one industrial cooked/smoker chamber with temperature, relative humidity (RH) and smoke production automatically controlled. Three stages of thermal treatment were applied: 1) 60 minutes at 50 °C, 2) 90 minutes at 53 °C and 3) 90 minutes at 55 °C. The three stages were performed with smoke production from a fire wood generator. In the second phase the product was submitted for about three days to traditional smokers where smoke was produced from firewood. After thermal treatment and until packaging operation, the final product remains in stabilisation for one day in a room with temperature around 17-19 °C and RH controlled at 75-85%. Total loss from dehydration is about 40% (processing yield - 60%).

### **Storage and sampling of product**

For each type of product, the experiments were conducted at a commercial meat plant in two batches (A1 and A2; R1 and R2) weighting 840 kg each. The study was based in 24 samples (each sample was composed by a mixture of three sausages) randomly drawn from the two batches at two different periods: 1) in the final product, beginning of shelf life period; 2) after 120 days at 20±5 °C in MAP. From each experiment 9 sausages were taken randomly for microbial analyses (a total of 72). From those, 36 were immediately analysed and remain samples were stored at 20±5 °C for 120 days (shelf-life period determined by the manufacturing industry) for further analysis. Representative sausages of each experiment were

packed separately in modified atmosphere (55% of N<sub>2</sub> and 45% of CO<sub>2</sub>) with a net weight of about 225g. The material package used was composed by plastic polymers laminate of several very thin polymers. It was used a Combitherm film, 70-300 mm, PA/EVOH/PE/SY – coextruded, laminate. Oxygen transmission rate (OTR) (cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>.day.atm) of this film is, for EVOH (ethylene vinyl alcohol), at 25 °C and 0% of relative humidity (RH), 0.01-0.02. In what concerns with PE (polyethylene) the OTR, at 25 °C and 0% of RH, presents values between 460 and 600 (Zagory, 1995). Polyamide (PA) polymer presents an OTR, at 23 °C and 0% of RH, of 30-110 (Salgueiro, 2001).

### **pH and water activity values**

pH was determined according standard method ISO R2917-1974 (ISO, 1974) with a solid sample potentiometer. Water activity ( $a_w$ ) was measured at 25 °C in a PROTIMER  $a_w$  analyser.

### **Microbial analyses**

Microbial analyses were performed in triplicate. Each sample was prepared from three sausages. Twenty five grams were removed (approximately 8 g from each sausage) and mixed into 225 ml of Peptone water (Merck; 7228) after cutter in pieces of 1 cm (suspension A). Ten fold dilutions were prepared taking 1 ml from the previous dilution into 9 ml 0.85% solution of sodium chloride (Merck, 6404).

For bacteria and fungi enumeration, samples (1 ml, 0.1 ml for staphylococci and, 0.5 ml for mould and yeast determination) from the dilution tubes were inoculated onto non-selective and selective media. The ten fold dilutions used for isolation of sporeformer bacteria, *Clostridium perfringens* and sulphite reduction clostridia were previously heated at 80 °C for 10 minutes. The selective media used for isolation of lactic acid bacteria was MRS-agar (Merck, 0660) incubated at 30 °C in carbon dioxide atmosphere (AnaerocultÒ, Merck, 1.13829) for 72 hours. The isolation of sporeformer bacteria was performed using Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) (Oxoid; CM127) and, after cooling, the plates were sealed with 0.08% of Agar (Himedia; RM026). These media were incubated aerobically at 30°C for 120 hours. Total mesophilic counts were performed according Official Portuguese Standards (NP 1995, 1982). The selective media used for isolation of staphylococci was Baird-Parker agar (Oxoid; CM275) supplemented with Egg Yolk – Tellurite emulsion (Oxoid; SR054C) with incubation at 37 °C for 48 h, aerobically. *Staphylococcus aureus* like colonies were confirmed by application of Pastorex STAPH-PLUS test (Sanofi Pasteur; 56356),

catalase test (20 vol. of  $H_2O_2$ ); gram staining; haemolytic activity (Plates with Columbia with 5% of sheep blood; BioMerieux; 43041) and cell morphology observation by phase-contrast microscopy. Enumeration of moulds and yeasts was performed according Official Portuguese Standards (NP 2077, 1985).

Viable counts per gram were transformed to logarithms (base 10).

Search analyses of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* were conducted after pre-enrichment of suspension A for 24 hours at 30 °C. *Listeria* search was performed by transfer 1 ml from suspension A into tubes with 10 ml of L-Palcam medium (Merck; 10823) supplemented with Oxoid SR150E. After incubation of the tubes at 30 °C for 24 hours 0,1 ml was transferred aseptically to Palcam agar plates (Oxoid; CM549) supplemented with Oxoid; SR150E, to differentiate colonies. After incubation of these plates at 30°C for 24 to 48 hours it was applied the catalase test (20 vol. of  $H_2O_2$ ); oxidase test (Bactident® oxidase; Merck; 1.13300.); gram coloration; haemolytic activity (Columbia+5% of sheep blood; BioMerieux; 43041) and cell morphology observation by phase-contrast microscopy. *Salmonella* search analysis was performed according Portuguese Standard Methods (NP 1933, 1982). Enterococci were determined using Azide Dextrose (Merck; 1590) after anaerobic incubation at 37 °C for 24 hours. From positive tubes (tubes with precipitation at the bottom of the tube) 1 ml was transferred aseptically into tubes with 10 ml of Ethyl Violet Azide broth (EVA-broth) (Difco; 0606-01-7). Positive results (violet precipitation at the bottom of the tube) were analysed after anaerobic incubation at 37°C for 48 hours. To search *Clostridium perfringens* and sulphite reducing clostridia, 1 ml from the dilution tubes were poured into *Perfringens* Agar Base (TSC) (Oxoid; CM 587), supplemented with cycloserine (Oxoid; SR088E) and into *Perfringens* Agar Base (OPSP) (Oxoid; CM 543), supplemented with sodium sulphadiazine (Oxoid, SR076) and with oleandomyxine and polymyxine B (Oxoid, SR077), respectively, and incubated at 37 °C under anaerobic conditions for 120 hours. Biochemical confirmation of positive results of *Clostridium perfringens* was performed according the Official Portuguese Standard (NP 2261,1986). Coliforms and *E. coli* search analysis were performed in accordance to the Official Portuguese Standard (NP 2164, 1983; NP 2308, 1986). Results of search analysis were reported as the number of samples containing positive results (presence of the organism).

### Statistical methods

Computational work was performed using a Statistic for Windows 5.0 software package (Statsoft, Inc.). Mean values were compared using ANOVA methodology

(One Way ANOVA). This procedure was performed after certification of the adjustment of the results to Gauss curve (Kolmogorov-Smirnov test) and application of the Levene Median test. Statistical significance of differences between means of log counts was determined by a Tukey's test. Significance was established at  $P < 0.05$ . Results reports the mean  $\pm$  standard deviation,  $n=6$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Water activity and pH results are presented in Table II. In Figures 1-4 is shown the viable counts of lactic acid bacteria (LAB), total mesophilic counts (TMC), sporeformer bacteria, staphylococci, moulds and yeasts (mean values and standard deviation,  $n=6$ ) for each type of product and, in both periods studied (in the beginning and in the end of shelf life period). The number of samples of chouriço type Alentejano and Ribatejano containing positive results (presence of the organism) of *Enterococcus*, *Clostridium perfringens*, sulphite reducing clostridia, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, coliforms and *Escherichia coli* in the beginning and in the end of shelf life period is shown in Tables III and IV.

TABLE II - MEAN VALUES AND STANDARD DEVIATION ( $n=6$ ) FOR pH AND  $a_w$  VALUES OF CHOURIÇO TYPE ALENTEJANO AND RIBATEJANO IN DIFFERENT PERIODS: FINAL PRODUCT, BEGINNING OF SHELF LIFE (P1) AND AFTER 120 DAYS AT  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  IN MODIFIED ATMOSPHERE  $55\% \text{N}_2/45\% \text{CO}_2$ , (P2).

Chouriço type Alentejano				Chouriço type Ribatejano			
$a_w$		pH		$a_w$		pH	
P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
0.93 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.01	5.80 $\pm$ 0.17	5.60 $\pm$ 0.00	0.94 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.01	5.70 $\pm$ 0.10	5.43 $\pm$ 0.06

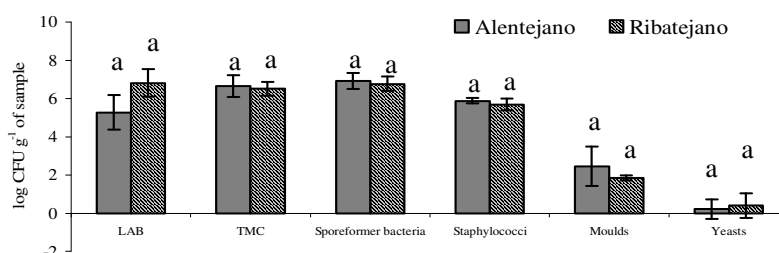


Figure 1. Mean values and standard deviation ( $n=6$ ) of viable counts ( $\log \text{CFU g}^{-1}$  of sample) of lactic acid bacteria (LAB), total mesophilic counts (TMC), sporeformer bacteria, staphylococci, moulds and yeasts, in both sausage types (Alentejano and Ribatejano) in the final product (beginning of shelf life period). For each group of micro-organisms, values with the same letter do not differ significantly ( $p > 0.05$ ).



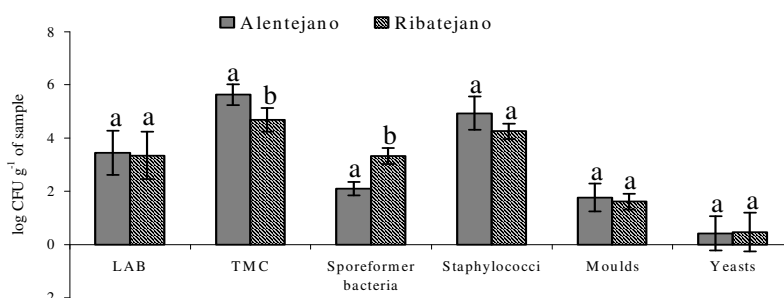


Figure 2. Mean values and standard deviation (n=6) of viable counts (log CFU g<sup>-1</sup> of sample) of lactic acid bacteria (LAB), total mesophilic counts (TMC), sporeformer bacteria, staphylococci, moulds and yeasts, in both sausages types (Alentejano and Ribatejano), after shelf life period (120 days at 20±5°C) in modified atmosphere package (55% N<sub>2</sub>/45% CO<sub>2</sub>). For each group of micro-organisms, values with the same letter do not differ significantly (p>0.05).

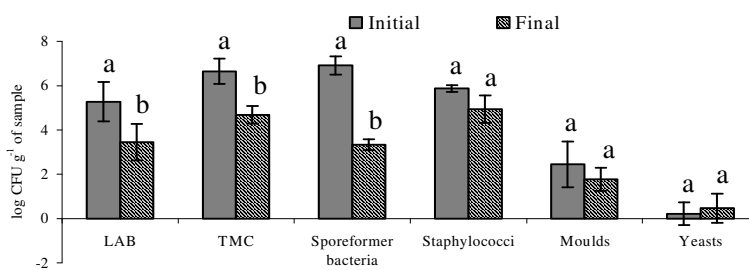


Figure 3. Viable counts (log CFU g<sup>-1</sup> of sample) of lactic acid bacteria (LAB), total mesophilic counts (TMC), sporeformer bacteria, staphylococci, moulds and yeasts, in the beginning (initial) and in the end of shelf life period (120 days at 20±5°C in modified atmosphere package, 55% N<sub>2</sub>/45% CO<sub>2</sub> (final) for chouriço type Alentejano. Results are reported as mean±standard deviation (n=6). For each group of micro-organisms, values with the same letter do not differ significantly (p>0.05).

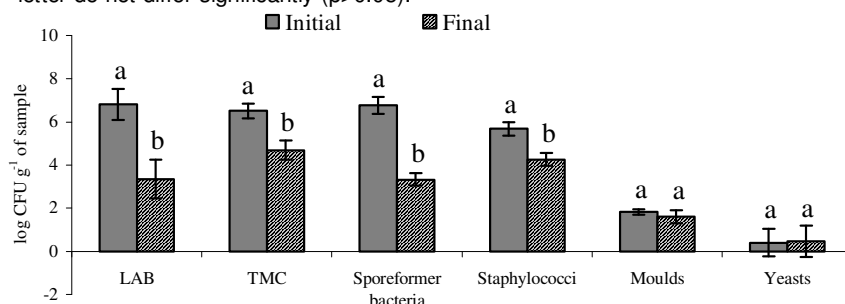


Figure 4. Viable counts (log CFU g<sup>-1</sup> of sample) of lactic acid bacteria (LAB), total mesophilic counts (TMC), sporeformer bacteria, staphylococci, moulds and yeasts, in the beginning (initial) and in the end of shelf life period (120 days at 20±5°C in modified atmosphere package, 55% N<sub>2</sub>/45% CO<sub>2</sub> (final) for chouriço type Ribatejano. Results are reported as mean±standard deviation (n=6). For each group of micro-organisms, values with the same letter do not differ significantly (p>0.05).

### pH and water activity

Table II shows changes in pH and in  $a_w$  of chouriço type Alentejano and Ribatejano in the final product and after 120 days at  $20\pm5^\circ\text{C}$  in MAP (45%  $\text{CO}_2$ /55%  $\text{N}_2$ ). A drop was noted during storage from the initial 5.80 to 5.60 and from 5.70 to 5.43 for product A and R, respectively. No changes were noted in water activity mean values. Lactic acid bacteria produce acids such as lactic acid, acetic acid and formic acid; the levels of which depending on genus, species and growth conditions which cause decrease in pH. The decrease in pH in meat products depends on the presence of fermentable carbohydrate. In the present work, the pH decrease in both types of sausages was similar and lower than the drop observed in Bologna-type sausages (from 6.3 to 5.6) (Borch *et al.*, 1996). This is possible due to a lower carbohydrate concentration in Portuguese sausages type Alentejano and Ribatejano.

TABLE III - NUMBER OF SAMPLES OF CHOURIÇO TYPE ALENTEJANO AND RIBATEJANO CONTAINING POSITIVE RESULTS (PRESENCE OF THE ORGANISM) OF *ENTEROCOCCUS*, *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, SULPHITE REDUCING CLOSTRIDIA, *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *SALMONELLA*, COLIFORMS AND *ESCHERICHIA COLI* IN THE BEGINNING OF SHELF LIFE PERIOD, FINAL PRODUCT.

Micro-organisms <sup>a</sup>	Chouriço type Alentejano		Chouriço type Ribatejano	
	Batches		Batches	
	1	2	1	2
- <i>Enterococcus</i> (0.001g)	3	3	3	3
- <i>Clostridium perfringens</i> (1 g)	0	0	0	0
- Sulphite reducing clostridia (0.01 g)	0	0	0	0
- <i>Listeria monocytogenes</i> (25 g)	0	0	0	0
- <i>Salmonella</i> (25 g)	0	0	0	0
- Coliforms (0.01 g)	0	0	0	0
- <i>Escherichia coli</i> (1 g)	0	0	0	0

Number of samples of chouriço type Alentejano and Ribatejano containing positive results (presence of the organism) of *Enterococcus*, *Clostridium perfringens*, sulphite reducing clostridia, *Listeria monocytogenes*,

### Microbial counts

For each type of product and, in both periods studied (in the beginning and in the end of shelf life period), mean values  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ) of microbial counts do not differ significantly ( $p>0.05$ ) between batches (data not shown), therefore data was combined and  $n=6$  was assumed.

TABLE IV - NUMBER OF SAMPLES OF CHOURIÇO TYPE ALENTEJANO AND RIBATEJANO CONTAINING POSITIVE RESULTS (PRESENCE OF THE ORGANISM) OF *ENTEROCOCCUS*, *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, SULPHITE REDUCING CLOSTRIDIA, *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *SALMONELLA*, COLIFORMS AND *ESCHERICHIA COLI* IN THE END OF SHELF LIFE PERIOD (120 DAYS AT  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  IN MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGE, 55%  $\text{N}_2$ /45%  $\text{CO}_2$ ).

Micro-organisms <sup>a</sup>	Chouriço type Alentejano		Chouriço type Ribatejano	
	Batches		Batches	
	1	2	1	2
- <i>Enterococcus</i> (0.001g)	3	3	3	3
- <i>Clostridium perfringens</i> (1 g)	0	0	0	0
- Sulphite reducing clostridia (0.01 g)	0	3	0	3
- <i>Listeria monocytogenes</i> (25 g)	0	0	0	0
- <i>Salmonella</i> (25 g)	0	0	0	0
- Coliforms (0.01 g)	0	0	0	0
- <i>Escherichia coli</i> (1 g)	0	0	0	0

<sup>a</sup> Reference values according the bacteriological standards for Portuguese food (Ribeiro, 1974): *Enterococcus*-negative in 0.001 g of product sample; sulphite reducing clostridia and coliforms-negative in 0.01 g of product sample; *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*-negative in 1 g of product sample; *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*-negative in 25 g of product sample (negative - not detected).

In the final product (beginning of shelf life period) (Fig. 1), total counts of lactic acid bacteria, moulds, yeasts, total mesophilic bacteria and sporeformer bacteria varied with the type of chouriço. However, no significant differences ( $p>0.05$ ) were detected in what concerns this parameter.

Results obtained indicated that lactic acid bacteria, sporeformer bacteria, staphylococci and total mesophilic bacteria constituted the predominant flora in the final product for both sausage types (Fig. 1). Mean values of total mesophilic counts varied between 6.65 (chouriço type A) and 6.51 (product type R) log CFU/g of sample of final product. Regarding with LAB, mean values of 5.28 and 6.82 log CFU/g were obtained for sausage type Alentejano and Ribatejano, respectively. These results are similar to those obtained by Lin and Lin (2002) in low fat Chinese-style sausage (mean value around 6.5 log CFU/g of sample) but, are lower than those achieved by Rosselló *et al.* (1995) in *Sobrasada* sausage (7.5 log CFU/g of sample), Ansorena *et al.* (2002) in Italian, Belgian and Norwegian fermented sausages (values obtained varied from 7.11 to 7.92 log CFU/g of sample), González and Díez (2002) in Spanish dry cured sausage (proximately 9.0 log CFU/g of sample), Coppola *et al.* (2000) in Naples-type salami (a fermented sausage) and Samelis *et al.* (1994) in naturally

fermented Greek dry salami (8.0 log CFU/g of sample). Fermentation promotes the growth of lactic acid bacteria (Demeyer *et al.* 1986) and, the values achieved in LAB counts in the final product may be depended of the fermentation period. In Portuguese smoked dry sausages, the maturation/fermentation period is very short, one to three days at temperature below 10°C. Considering this fact is normal to expect inferior values in Portuguese smoked sausage when compared with fermentation periods of several days in the others types of sausage.

Mean values of sporeformer mesophilic bacteria counts (log CFU g<sup>-1</sup> of sample) were very similar in both types of product (6.92 for chouriço type A and 6.77 for chouriço type R) (Fig 1). Encinas *et al.* (1996), in spanish fermented sausages during the manufacture and ripening, because of the high numbers observed during fermentation, considered *Bacillus* the second most important bacterial group after lactic acid bacteria. Samelis *et al.* (1998) stated the possibility of these type of micro-organisms sporeformers being acquired from the spices and, Banerjee and Sarkar (2003), Kneifel and Berger (1994), Antai (1988) and, Powers *et al.* (1976), have demonstrated that *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* are the sporeformers commonly found in spices. Also te Giffel *et al.* (1996) showed the high prevalence of *Bacillus* species in meat products compared with raw meat (Kramer & Gilbert, 1989; Konuma *et al.*, 1988) confirming the role played by meat additives as a source of contamination of these species. Trigo and Fraqueza (1998) also discussed that mesophilic spores such as *Bacillaceae* were dominant in beef dry casings which are the same type of casings used in the manufacture of the sausage type Alentejano studied in this work.

Staphylococci counts in the final product (Fig. 1) revealed mean values of 5.68 (chouriço type A) and of 5.88 (chouriço type R) log CFU/g of product sample and, after shelf life period in MAP (Fig. 2) mean values of 4.94 (product A) and of 4.26 (product R) log CFU/g of sample. *Staphylococcus aureus* like colonies, in both types of product and in both periods studied, were not confirmed by the Pastorex STAPH-PLUS test. Samelis *et al.* (1998), in traditional Greek dry salami, described count results in all analyses performed between 2.0 and 3.0 log CFU/g of sample of final product.

Staphylococci contribute to colour stability and flavour development in dry and semi-dry fermented sausages (Holley & Blaszyk, 1998) and, some studies clearly show that the aroma of fermented meat products can be modulated by the presence of *Staphylococcus* spp. (Stahnke, 1994; Berdagué *et al.*, 1993). Without adding starter cultures, the *Micrococcaceae* present in these products come from the meat

itself or the environment and constitute a part of the so-called "house flora". However, the evolution of *Micrococcaceae* during ripening has largely been ignored (García-Varona *et al.*, 2000).

After 120 days in MAP at 25 °C, comparing the two types of chouriço, significant differences were observed in total mesophilic counts and sporeformer bacteria counts (Fig. 2). For total mesophilic counts, values were significantly higher in sausage type Alentejano and, sporeformer bacteria results obtained revealed higher values for chouriço type Ribatejano. Differences founded between products may be related with factors such as the raw meat material, the formulation ingredients and/or the type of casings and their influence on the spoilage bacteria which will survive during storage period. Remain groups of micro-organisms do not differ significantly between the two types of product.

Microbial population, in both types of product, was significantly affected by shelf life period in MAP at 2.5°C (Fig. 3-4). For product type Ribatejano, shelf life promoted a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in total counts of all groups of micro-organisms with exception in fungi and, for chouriço type Alentejano, significant decreasing values were obtained for LAB, sporeformer bacteria and total mesophilic counts.

The microbial counts values obtained after shelf life period in the present study confirmed that shelf life of MA-packed chouriço should preferably be defined by unacceptable appearance (slime, drip loss) rather than a certain maximum acceptable bacterial level, which is in agreement with the results obtained by Pexara *et al.* (2002) in cured, cooked, sliced turkey fillets and in cooked pork sausages stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10 °C.

In the present study yeast counts revealed almost inexistent (mean values varied from 0.21 to 0.47 log CFU/g of sample) in both types of sausage in the two periods studied (Fig. 1-4). These results are in agreement with the results found by Sousa and Ribeiro (1983) in Portuguese sausage types in which all results for mould and yeast together were below 100 CFU/g of the final product. Encinas *et al.* (2000) in Spanish fermented sausage smoking varieties found mean values of yeast counts lower than in non-smoked sausage types and, among all varieties studied by these authors, the lowest mean value was found in sausages hot-smoked (16 CFU/g) compared with the others types of sausages in which the values varied from 1000 to 100000 CFU/g. Smoke does affect yeasts (Leistner, 1995), and factors such as time and temperature influence this effect. Also addition of some ingredients has influence on yeast growth, Asehraou *et al.* (1997) and Ghamnnon (1990) founded an inhibitory effect of garlic on yeasts.

Mould counts mean results varied between 1.61 and 1.84 log CFU/g of product sample for Ribatejano sausage in the beginning and at the end of shelf life and, from 1.77 to 2.45 log CFU/g of sausage type Alentejano in the same two periods (Fig. 1-4). Analysing among products, sausage type Alentejano seems to present higher values comparatively with the type Ribatejano, however differences obtained were not significant ( $P>0.05$ ). These results are similar to those found by Ansorena *et al.* (2002). These authors founded in Italian sausage a mean value of 2.12 log CFU/g for yeast and mould together counts.

The presence of aerobic microflora such as sporeformer bacteria (namely *Bacillaceae*) and fungi in these MAP chouriços, which the air in the package was replaced by a specific mixture of carbon dioxide and nitrogen (55% N<sub>2</sub> and 45% CO<sub>2</sub>), can be explained considering that oxygen is not always completely removed and may also permeate through the packaging material (Vermieren *et al.*, 1999). Gases used in MAP permeate all common food packaging film by diffusion and so the shelf life is directly affected by the rate of diffusion. However, the cost of the films increases with increasing barrier (Robertson, 1993). Thus, a trade off in shelf life versus cost must be made. Additionally, the level of residual oxygen in MAP packs may be due to other factors such as the ability of the food to trap air, poor heat sealing ability of the packaging material causing air to leak in ineffective evacuation and/or ineffective gas flushing (Smith *et al.*, 1986), the storage period and temperature (Smiddy *et al.*, 2002). The effectiveness of CO<sub>2</sub> as a bacteriostatic is dependent on its solubility in the aqueous portion of the food. As the storage temperature increases, solubility and thus ability of the gas to inhibit growth decreases. For maximum anti-microbial effect, the storage temperature should be kept as low as possible (Carr and Marchello, 1986).

Considering the industry packaging technology applied, further studies should be conducted in order to investigate the influence of factors such as the packaging material, the production costs, the ability of the food to trap air, the heat sealing ability of the packaging material and the storage temperature on the stability of the product along shelf life period and to establish the optimal relationship between these parameters.

### Search analyses

Results of search analyses are presented in Table 3 (final product, beginning of shelf life period) and in Table 4 (end of producer-defined shelf life). On the basis of the results, enterococci constitute the predominant group. For this group, the incidence

of positive results was 100% in 0.01 g of product sample in both sausage types and in both periods studied (Table 3-4). High levels of *Enterococcus* were also reported by Ansorena *et al.* (2002) in Italian and Belgian fermented sausages and by Samelis *et al.* (1998) in traditional Greek salami. Samelis *et al.* (1998) showed that enterococci increased during early fermentation and remained at a level above 100 000 CFU/g in most samples. Considerations about their significance vary as enterococci may enhance sausage aroma and taste by their proteolytic activities, but may also compromise safety if opportunistic pathogenic strains proliferate (Holley *et al.*, 1988b). The role of enterococci in Portuguese smoked sausages should be evaluated.

*Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, coliforms and *E. coli* were not detected in any of the samples analysed (Table III-IV). Sulphite reducing clostridia search analysis revealed that only six samples (three samples of each type of product from batch 2, A2 and R2), in the end of shelf life period (Table IV), were not in accordance to the bacteriological standard for portuguese food (negative in 0.01 g of product) (Ribeiro, 1974).

Portuguese smoked sausages, due to intrinsic characteristics such as low water activity, make it resistant to putrefaction and germination of clostridia spores, eventually presents, especially *Clostridium botulinum* (Sousa & Ribeiro, 1983).

The absence of positive results for coliforms and *E. coli* (Table 3-4) can indicate a well accept hygienic level in normal plant practice. Generally, it appears that the hygiene level is very poor throughout the traditional preparation of this food. There are some factors which favour the growth of *Enterobacteriaceae* during sausage production including a high initial pH value, a high initial water activity, a low concentration of fermentable carbohydrates, low numbers of lactobacilli in the fresh sausage mixture and, sometimes, not low enough ripening temperatures. However, *Enterobacteriaceae* are rarely found in long-ripening-period meat products due to their high sensitivity to acidity and desiccation (Lucke, 1986).

## CONCLUSIONS

In spite of the high storage temperature (20±5 °C) and the long shelf life period (120 days in MAP), results obtained revealed a well accept hygienic level in both types of product. In fact, shelf life promoted a significant decrease ( $P<0.05$ ) in total counts of all groups of micro-organisms, with exception in fungi, in chouriço type Ribatejano and, for chouriço type Alentejano, significant decreasing values were obtained for LAB, sporeformer bacteria and total mesophilic counts. Moreover,

*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, coliforms and *Escherichia coli*, were not detected in any of the samples analysed and, for sulphite reducing clostridia, search analysis revealed that only six samples (50% of prevalence), in the end of shelf life period, were not in accordance to the bacteriological standard for portuguese food. Decreasing microbial counts results obtained after shelf life period confirmed that shelf life of MA-packed chouriço should preferably be defined by unacceptable appearance (slime, drip loss) rather than a certain maximum acceptable bacterial level. However, the presence of aerobic microflora such as sporeformer bacteria (namelly *Bacillaceae*) and fungi in these MAP chouriços, which the air in the package was replaced by a specific mixture of carbon dioxide and nitrogen (55% N<sub>2</sub> and 45% CO<sub>2</sub>), demands further studies in order to investigate the influence of factors such as the packaging material, the production costs, the ability of the food to trap air, the heat sealing ability of the packaging material and the storage temperature on the stability of the product along shelf life period and, to establish the optimal relationship between these parameters.

Besides this, is also vital to identify and characterise the spoilage micro-organisms which will survive during shelf life period regarding the stability and safety of the product during storage period.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their gratitude to the Foundation for Science and Technology (Portugal) (Project Praxis XXI / BD / 19796 / 99) for its financial support and to the Agricultural Superior School of Santarém (Portugal), department of Biosciences, for permitting the development of experimental work.

#### REFERENCES

- ANSORENA, D., MONTEL, M.C., ROKKA, M., TALON, R., EEROLA, S., RIZZO, A., RAEMAEKERS, M. and DEMEYER, D., 2002). Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*, 61, 141-147.
- ANTAI, S. P., 1988. Study of the *Bacillus* flora of Nigerian spices. *International Journal of Food Microbiology*, 6, 259-261.
- ASEHRAOU, A., MOHIEDDINE, S., FAID, M., e SERHROUCHNI, M., 1997. Use of antifungal principles from garlic for the inhibition of yeasts and moulds in fermenting green olives. *Grasas y Aceites*, 48, 68-73.



- BANERJEE, M. and SARKAR, P. K., 2003). Microbiological quality of some retail spices in India. *Food Research International*, 36 469-474.
- BERDAGUÉ, J. L., MONTEL, M. C. and TALON, R., 1993. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausages. *Meat Science*, 35: 275-287.
- BORCH, E., BERG, H. and HOLST, O., 1991. Heterolactic fermentation by a homofermentative *Lactobacillus* sp. during glucose limitation in anaerobic continuous culture with complete cell recycle. *Journal of Applied Bacteriology*, 71: 265-269.
- BORCH, E., KANT-MUERMANS, M.L. and BLIXT, Y., 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 103-120.
- GARR, T. P. and MARCHELLO, J. A., 1986. Microbial changes of precooked beef slices as affected by packaging procedure. *Journal of Food Protection*, 49(7): 534-536.
- COCOLIN, L., MANZANO, M., AGGIO, D., CANTONI, C. and COMI, G., 2001). A novel polymerase chain reaction (PCR) – denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of *Micrococcaceae* strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science*, 57: 59-64.
- COPPOLA, S., MAURIELLO, G., APONTE, M., MOSCHETTI, G., & VILLANI, F. (2000). Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Science*, 56, 321-329.
- DAPORTA PADIN, P. M., 1988. Microorganismos de interés tecnológico con especial referencia a *Micrococcaceae* en chorizos de las variedades "Cantimpalos" y "Cerdo ibérico" (Guijuelo). Research Project, León, España.
- DEMEYER, D.I., VERPLAETSE, A. and GISTELINCK, M., 1986. Fermentation of meat and integrated process. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*, 41:131-139.
- DEVRIESE, L. A., POT, B., VAN DAMME, L., KERSTERS, K., and HAESBROUCK, F., 1995. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 187-197.
- ENCINAS, J. P., SANZ-GÓMEZ, J., GARCÍA-LÓPEZ, M. L., GARCÍA-ARMESTO, M. R. and OTERO, A., 1996. Evaluation of different systems for the identification of *Bacillus* strains isolated from Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 42: 127-131.
- ENCINAS, J.P, LÓPEZ-DÍAZ, T.M., GARCÍA-LÓPEZ, M.L., OTERO, A. and MORENO, B., 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 54: 203-208.
- GARCÍA-VARONA, M., SANTOS, E. M., JAIME, I. and ROVIRA, J., 2000. Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology*, 54: 189-195.
- GHAMNNOUM, M.A., 1990. Inhibition of *Candida* adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Allium sativum* (garlic). *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 163-169.

- GONZÁLEZ, B., and DíEZ, V., 2002. The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of “chorizo” – a Spanish dry cured sausage. *Meat Science*, 60: 295-298.
- HOLLENBECK, C.M., 1994. Contribution of smoke flavourings to processed meats. In: *Flavour of meat and meat products*. Edited by Shahidi F. Chapman & Hall. London. UK, 199-210.
- HOLLEY, R.A., LAMMERDING, A.M. and TITTIGER, F., 1988a). Microbiological safety of traditional and starter-mediated processes for the manufacture of Italian dry sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 7: 49-62.
- HOLLEY, R.A., LAMMERDING, A.M. and TITTIGER, F., 1988). Occurrence and significance of streptococci in fermented Italian type dry sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 7: 63-72.
- HOLLEY, R. A. and BLASZYK, M., 1998. Antibiotic challenge of meat starter cultures and effects upon fermentations. *Food Research International*, 30(7): 513-522.
- HOTCHKISS, J. H., 1989. Modified atmosphere packaging of poultry and related products. In: *Controlled/Modified Atmosphere/Vacuum Packaging of Foods* (edited by A.L. Brody). Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull, CT, pp. 39-58.
- HOTCHKISS, J. H. and LANGSTON, S. W., 1995. MAP of cooked meat and poultry products. In: *Principles of modified-atmosphere and sous vide product packaging*. Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania. U.S.A. (Edit. Farber, J.M. and Dodds, K.L.). pp. 137-152.
- HUGAS, M., GARRIGA, M. and AYMERICH, M. T., 2003). Functionalty of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 12: 201-212.
- JAY, J.M., 2000. Food preservation with chemicals. *Modern food Microbiology*. Aspen Publisher, Inc. pp. 253-281.
- KNEIFEL, W. and BERGER, E., 1994. Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *Journal of Food Protection*, 57: 893-901.
- KONUMA, H., SHINAGAWA, K., TOKUMARU, M., ONOUE, Y., KONNO, S., FUJINO, N., SHIGEHISA, T., KURATA, H., KUWABARA, Y. and LOPES, C. A. M., 1988). Occurrence of *Bacillus cereus* in meat products, raw meat and meat product additives. *Journal of Food Protection*, 51: 324-326.
- KRAMER, J. M. and GILBERT, R. J., 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: *Food-borne Bacterial Pathogens* (edited by J. P. Doyle). Pp. 21-77. New York, Marcel Dekker.
- LEISTNER, L., 1995) Stable and safer fermented sausages word-wide. In G. Campbell-Platt, P.E. Cook, *Fermented meats* (pp. 160-175). Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- LIN, K.W. and LIN, S.N., 2002. Effects of sodium lactate and trisodium phosphate on the physicochemical properties and shelf life of low-fat Chinese–style sausage. *Meat Science*, 60: 147-154.
- LUCKE, F.K., 1986. Microbial processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. *Fleischwirtschaft*, 66: 1505-1509.

- MARCHESINI, B., BRUTTIN, A., ROMAILLER, N., MORETON, R.S., STUCCHI, C. and SOZZI, T., 1992. Microbiological events during commercial meat fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 203-209.
- NP 1933, 198). Regras gerais para pesquisa de *Salmonella*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa. Portugal.
- NP 1995, 1982. Regras gerais para contagem de microrganismos a 30 °C. Instituto Português da Qualidade. Lisboa. Portugal.
- NP 2164, 1983. Regras gerais para pesquisa de bactérias coliformes. Instituto Português da Qualidade. Lisboa. Portugal.
- NP 2077, 1985. Carnes e produtos cárneos. Contagem de bolores e leveduras. Instituto Português da Qualidade. Lisboa. Portugal.
- NP 2261, 1986. Regras gerais para a contagem de *Costridium perfringens*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa. Portugal.
- NP 2308, 1986. Regras gerais para a pesquisa de *Escherichia coli*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa. Portugal.
- PAPA, F., ZAMBONELLI, C. and GRAZIA, L., 1995. Production of Milano style salami of good quality and safety. *Food microbiology*, 12: 9-12.
- PAPAMANOLI, E., TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. and KOTZEKIDOU, P., 200). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65: 859-867.
- PEXARA, E. S., METAXOPOULOS, J. and DROSINOS, E. H., 2002. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages –"piroski"- stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10 °C. *Meat Science*, 62: 33-43.
- POWERS, E. M., LATT, T. G. and BROWN, T., 1976. Incidence and levels of *Bacillus cereus* in processed spices. *Journal of Milk and Food Technology*, 39: 668-670.
- RIBEIRO, A.M.R., 1974. Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. *Revista de Microbiologia*, S. Paulo, 5 (1): 17-25.
- ROBERTSON, G. L., 1993. *Food Packaging – Principles and Practice*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 550-588.
- ROSSELLÓ, C., BARBAS, J.I., BERNA, A. and LÓPEZ, N., 1995. Microbial and chemical changes in Sobrasada during ripening. *Meat Science*, 40: 379-385.
- SALGUEIRO, E. R. M., 2001. Embalagens para produtos cárneos transformados. Trabalho de Fim de Curso. Escola Superior Agrária de Santarém. Santarém. Portugal. pp.12-36.
- SAMELIS, J., STAVROPOULOS, S., KAKOURI, A. and METAXOPOULOS, J., 1994. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiology*, 11, 447-460.

- SAMELIS, J., METAXOPOULOS, J., VLASSI, M. and PAPPAS, A., 1998. Stability and safety of traditional Greek salami – A microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 69-82.
- SANTOS, E. M., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., JAIME, I., and ROVIRA, J., 1998. Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of “chorizo”. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 123-128.
- SMIDDY, M., PAPKOVSKY, D. and KERRY, J., 2002. Evaluation of oxygen content in commercial modified atmosphere packs (MAP) of processed cooked meats. *Food Research International*, 35: 571-575.
- SMITH, J. P., OORAİKUL, B., KOERSON, W. J. and JACKSON, E. D., 1986. Novel approach to oxygen control in modified atmosphere packaging of bakery products. *Food Microbiology*, 3: 315-320.
- SOUSA, M.C. and RIBEIRO, A.M.R., 1983. Chouriço de carne português: tecnologia da produção e caracterização química, microbiológica e imunológica. *Indústria Alimentar*, 1: 14-23.
- STAHNKE, L. H., 1994. Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum*. *Meat Science*, 38: 39-53.
- TE GIFFEL, M. C., BEUMER, R. R., LEIJENDEKKERS, S. and ROMBOUTS, F. M., 1996. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiology*, 13: 53-58.
- TRIGO, M. J. and FRAQUEZA, M.J., 1998. Effect of gamma radiation on microbial population of natural casings. *Radiation Physics and Chemistry*, 52: 125-128.
- VERMIEREN, L., DEVLIEGHERE, F., VAN BEEST, M., DE KRUIJF, N. and DEBEVERE, J., 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 77-86.
- WENDORFF, W.L., 1981. Antioxidant and bacteriostatic properties of liquid smoke. In *Proceedings of Smoke Symposium*, Red Arrow Products Co., Manitowoc, WI, pp. 73-87.
- ZAGORY, D., 1995. Principles and practice of modified atmosphere packaging of horticultural commodities. In: *Principles of modified-atmosphere and sous vide product packaging*. Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania. U.S.A. (Edit. Farber, J.M. and Dodds, K.L.), pp. 175-206.

## HOLDING PEN ENVIRONMENT EFFECTS ON SKIN TEMPERATURE, RECTAL TEMPERATURE AND MILK PRODUCTION IN JERSEY COWS

M.G. PINHEIRO<sup>1</sup>, J.R. NOGUEIRA<sup>1</sup>, M.L.P. LIMA<sup>1</sup>, P.R. LEME<sup>2</sup>, M. MACARI<sup>3</sup>, A. NÃÃS<sup>4</sup>, I.A. LALONI<sup>5</sup>, L.C. ROMA JR.<sup>6</sup>, E.A. TITTO<sup>2</sup> e A.F. PEREIRA<sup>7</sup>

1 Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Leste, APTA/SAA, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 2 Departamento de Zootecnia, FZEA/USP, Pirassununga, SP, Brasil; 3 Departamento de Fisiologia Animal, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 4 Departamento de Construções Rurais, FEAGRI/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil; 5 Departamento de Construções Rurais, FEAGRI/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil; 6 Clínica do Leite, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil; 7 Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Évora, Portugal

*(Recepção: 30 de Janeiro de 2004; Aprovado: 25 de Fevereiro de 2005)*

### ABSTRACT

This work was carried out at the Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Leste, Ribeirão Preto, SP, Brazil, to assess the effects of the use of sprinkler and fans on skin temperature, rectal temperature and milk production. Twenty nine Jersey cows were distributed in two management schemes, with access to holding pen adjacent to the milking parlor cooled (cooled) and not access (control). Skin temperature and rectal temperature were significantly lower for the cooled cows than the control cows. Milk production was not significantly different between the management schemes.

**Key-words:** environment, Jersey cows, milk production, rectal temperature, skin temperature

### EFEITO DO AMBIENTE PRÉ-ORDENHA (SALA DE ESPERA) SOBRE A TEMPERATURA DA PELE, A TEMPERATURA RETAL E A PRODUÇÃO DE LEITE DE BOVINOS DA RAÇA JERSEY

### RESUMO

Este trabalho realizou-se no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Leste, Ribeirão Preto e teve como objetivo avaliar o efeito da utilização de chuveiro e ventiladores sobre a temperatura da pele, a temperatura retal e a produção de leite em bovinos da raça Jersey durante o Verão. Foram utilizadas 29 vacas, distribuídas em dois esquemas de manejo: com acesso à sala de espera resfriada e sem acesso (controle). As vacas que permaneceram na sala de espera

resfriada apresentaram temperaturas da pele e rectal significativamente inferiores às das vacas do grupo controlo. Não se verificaram diferenças significativas na produção de leite entre os dois esquemas de manejo.

**Palavras-chave:** ambiente, produção de leite, raça Jersey, temperatura da pele, temperatura retal

## INTRODUÇÃO

A produção de leite num ambiente tropical pode ser melhorada com o uso de tecnologias que possam garantir um manejo mais adequado do rebanho. Os animais domésticos são homeotérmicos necessitando manter sua temperatura interna dentro de limites estreitos e, para isso, mantêm uma troca constante de energia com o meio ambiente. Quando os bovinos leiteiros são expostos a temperaturas que não se situam na zona de termoneutralidade tendem a efectuar ajustamentos metabólicos para manter a homeotermia (Collier *et al.*, 1982).

O stress térmico influencia a produção de leite, sendo um dos problemas mais graves nos rebanhos leiteiros nas regiões tropicais. As elevadas temperatura e humidade relativa, assim como a intensa radiação solar, são factores climáticos que causam stress e que estão frequentemente associados com baixos desempenhos do gado leiteiro. As vacas em lactação são particularmente sensíveis ao stress térmico devido à sua função produtiva específica que requer uma grande disponibilidade energética e intensa actividade metabólica que conduz a uma grande produção de calor endógeno (Baccari Jr., 1989). A resposta das vacas leiteiras ao stress provocado pelo calor inclui: o aumento da frequência respiratória e da temperatura corporal, as reduções da ingestão de matéria seca (principalmente da componente grosseira), da produção de leite e do teor butiroso e ainda o aumento das necessidades de manutenção e a diminuição da actividade física, especialmente durante as horas mais quentes do dia (Baccari, 1998).

Diversas alterações do ambiente térmico podem ser utilizadas com o objectivo de reduzir o stress térmico. O sombreamento, natural ou artificial, é considerado essencial para manter a eficiência da produção de leite em climas quentes. O seu principal objectivo é o de reduzir a carga térmica radiante e proteger o animal contra os efeitos da intensa radiação solar directa, difusa e reflectida (Buffington *et al.* 1983). As árvores (principalmente as mais altas e com copa mais densa) fornecem sombras de elevada qualidade, protegendo efectivamente da radiação solar e deixando o ambiente mais húmido e fresco. Tal como refere Baccari (1998), a melhor sombra é a fornecida por árvores, isoladas ou em grupo, sugerindo dever ser parte

obrigatória das pastagens ou dos parques, de modo a diminuir os efeitos nefastos da incidência da radiação solar directa, principalmente durante o Verão.

O stress térmico em vacas leiteiras também pode diminuir mediante o uso de ventiladores e/ou de métodos artificiais de arrefecimento, variando os seus benefícios de acordo com o sistema adoptado, o clima e o nível produtivo dos animais. O uso de sistemas de aspersão ou de nebulização associados à ventilação pode ser eficiente no arrefecimento das instalações e consequentemente no conforto dos animais.

Currais e salas de espera de ordenha arrefecidas aumentam o período de tempo em que as vacas leiteiras ingerem alimento (Huber, 1989). Segundo este autor, se se verifica o arrefecimento da sala de espera (antes e depois da ordenha), após a ordenha ao regressarem ao curral as vacas ingerem alimento durante um maior período de tempo. A sala de espera anexa à sala de ordenha é, na maioria das fazendas, a área mais stressante para as vacas em lactação. Quando uma vaca é confinada na sala de espera durante 15 a 60 minutos, duas ou três vezes por dia, o stress pode ocorrer mesmo a uma temperatura ambiente moderada (Armstrong, 1994).

A sensação de conforto térmico é função da activação de termosensores periféricos localizados principalmente na periferia do animal, sendo a temperatura da pele uma das variáveis mais importantes neste processo (Fanger, 1970). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi o de estudar o efeito da utilização de chuveiro e de ventiladores na sala de espera na temperatura da pele, na temperatura rectal (indicador do conforto térmico) e na produção de leite em bovinos da raça Jersey.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Leste, APTA/SAA, Ribeirão Preto, SP, Brasil. A Região de Ribeirão Preto situa-se na latitude 21° 11' S e longitude 47° 48' W, com uma altitude média de 621 m. A precipitação média anual é de 1416 mm, com maior incidência durante o Verão, sendo a temperatura média de 21,6 °C.

Foram utilizadas 29 vacas da raça Jersey, em lactação, distribuídas em dois esquemas de manejo (A e B). No tratamento A, antes da ordenha, os animais permaneceram em média 30 minutos, numa sala de espera com chuveiros e ventiladores. No tratamento B, que funcionou com controle, os animais não tiveram

acesso à referida sala de espera. As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, em ordenha mecânica em intervalos de 12 horas aproximadamente.

Os animais permaneceram em parques com pastagem constituída por gramínea *Panicum maximum* cv. Tanzânia, num esquema de pastoreio rotacional. Os animais tiveram livre acesso a área sombreada de bosque. Foi fornecida ração constituída por de milho, bagaço de soja, caroço de algodão e sorgo picado. O controle leiteiro foi efectuado durante cinco dias por semana, sendo registada a temperatura da pele e a temperatura retal dos animais, após a segunda ordenha. A temperatura da pele foi medida na cabeça, no dorso, na canela e no úbere, através de termómetro de infravermelho digital. A média ponderada foi calculada atribuindo-se peso de 10 % para a cabeça, 70 % para o dorso, 12 % para a canela e 8 % para o úbere.

A medição das variáveis climáticas foi efectuada diariamente, tanto no exterior como no interior das instalações, os valores do ambiente externo foram fornecidos pelo Instituto Agronómico, situado aproximadamente a 3 km.

Os dados foram analisados pelo programa SAS (SAS Institute Inc.), pelo GLM, sob um modelo que para a variável produção de leite teve como efeitos fixos o estadio da lactação e os, e para as análises das temperatura da pele e rectal apenas o factor tipos de manejo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias da temperatura da pele, da temperatura retal e da produção de leite figuram no Quadro I. Registou-se um efeito significativo ( $P < 0,01$ ) do tratamento na temperatura da pele e na temperatura rectal. As vacas que dispuseram da ante-sala de ordenha arrefecida, apresentaram uma temperatura significativamente mais baixa. Wiersma *et al.* (1983) também verificaram que a temperatura rectal mais é baixa (1,7 °C) nas vacas que tiveram acesso à sala de espera arrefecida (com aspersores e ventiladores). No sistema de aspersão directa, quando a água humedece completamente a pelagem e a pele, as vacas são arrefecidas inicialmente por condução e posteriormente também por evaporação da água da pele num valor correspondente ao calor latente de vaporização e aos gramas de água evaporados (Baccari, 1998). A ventilação forçada pode incrementar esta perda de calor devido à convecção que incrementa a velocidade de vaporização e que conduz a um maior aumento da dissipação de calor e por consequência a uma redução mais acentuada da temperatura corporal.



QUADRO I - TEMPERATURA DA PELE, TEMPERATURA RECTAL E PRODUÇÃO DE LEITE EM BOVINOS DA RAÇA JERSEY SUBMETIDOS A DOIS ESQUEMAS DE MANEJO.

FaCtores	Temperatura da pele (°C)	Temperatura retal (°C)	Produção de leite (kg)
Com acesso à sala de espera	34,57±0,13	38,59±0,06	12,24±0,57
Sem acesso à sala de espera	35,52±0,13	39,11±0,06	11,68±0,56

Verificou-se um efeito significativo ( $P<0,01$ ) do estágio da lactação na produção de leite. No Quadro II figuram os valores médios da produção de leite de acordo com o estágio da lactação.

QUADRO II - PRODUÇÃO DE LEITE DE ACORDO COM O ESTÁGIO DE LACTAÇÃO EM BOVINOS DA RAÇA JERSEY.

Estágio da lactação (dias)	Produção de leite
0 a 60	15,98±0,94
61 a 120	14,40±0,94
121 a 240	10,24±0,71
Acima de 240	07,24±0,66

Não se observou um efeito significativo ( $P>0,05$ ) da idade da vaca ao parto na temperatura da pele, na temperatura retal e na produção de leite. O estágio da lactação não teve um efeito significativo ( $P>0,05$ ) na temperatura da pele e na temperatura retal.

Não se registaram diferenças significativas da produção de leite ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos. Resultados semelhantes foram verificados por Arcaro *et al.* (2001) que trabalharam com sala de espera arrefecida através de ventilação e aspersão. No entanto, este resultado difere dos observados por Wiersma *et al.* (1983), que observaram uma maior produção de leite (0,79 kg) nas vacas que tiveram acesso à sala de espera arrefecida, durante os meses de Verão (neste caso com temperaturas máximas entre 27 e 46 °C). No período em que foi desenvolvido o presente estudo, a temperatura máxima variou de 27,5 a 35,1°C, a humidade relativa entre 53 a 94% e a precipitação acumulada foi de 170,7 mm.

A ausência de diferenças significativas nas produções de leite entre os dois tratamentos pode estar associada ao facto das vacas terem tido acesso a ambiente sombreado durante as horas mais quentes do dia. A diminuição da radiação directa recebida pelos animais durante as horas mais quentes poderá ter determinado menores armazenamentos de calor com reflexos positivos na estabilidade da temperatura rectal. Como tal, o stress térmico foi menos acentuado, atenuando as repercussões negativas na ingestão de alimento e no balanço endócrino e consequentemente a produção de leite.

Um outro aspecto a salientar refere-se à interacção entre o potencial produtivo das vacas Jersey e a sua tolerância ao calor. Muitos estudos têm referido que as vacas Jersey apresentam uma maior tolerância ao calor. De acordo com Müller (1989), a produção de leite na raça Holandesa diminui a partir de 24 °C e nas raças Suíça e Jersey a partir de 27 °C. Esta maior tolerância pode explicar o facto dos efeitos benéficos da presença na sala refrigerada se repercutirem positivamente nas temperaturas da pele e rectal mas não reflectirem vantagens significativas na produção de leite.

Em conclusão, pode referir-se que nas condições em que foi realizado o presente estudo, pode-se concluir que, apesar da inexistência de diferenças significativas nas produções de leite entre os dois tratamentos, a utilização de chuveiro e de ventiladores na sala de espera conferiu maior conforto térmico aos bovinos da raça Jersey em lactação, sugerindo que a sua utilização pode ser ainda mais vantajosa em condições ambientais mais desfavoráveis e/ou com genótipos menos tolerantes ao calor, possibilitando aos animais níveis superiores de Bem-Estar.

## BIBLIOGRAFIA

- ARCARO JR. I., ARCARO, J.R.P., POZZI, C.R., MATARAZZO, S.V. e FAGUNDES, H., 2001. Produção e composição do leite de vacas Holandesas em sala de espera climatizada. In: Congresso Brasileiro de Biometeorologia, III, Maringá, 2001. Anais. Maringá, Sociedade Brasileira de Biometeorologia. (CD-ROM).
- ARMSTRONG, D.V., 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. J. Dairy Sci., 77 (7): 2044-2050.
- BACCARI, F.Jr., 1989. Manejo ambiental para produção de leite nos trópicos. In: Ciclo Internacional de Palestras sobre Bioclimatologia Animal, 1º, Botucatu, 1986, Anais. Jaboticabal, FUNEP, pp.83-109.

- BACCARI, F. Jr., 1998. Manejo ambiental para produção de leite em climas quentes. In: Congresso Brasileiro de Biometeorologia, II, Goiânia, 1998. Anais. Goiânia, Sociedade Brasileira de Biometeorologia, pp.136-161.
- BUFFINGTON, D.E., COLLIER, R.J. e CANTON, G.H., 1983. Shade management systems to reduce heat stress for dairy cows in hot, humid climates. Trans. ASAE, pp.1798-1802.
- COLLIER, R. J., BEEDE, D. K., THATCHER, W.W., ISRAEL, L. A. e WILCOX, C. J., 1982. Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. J. Dairy Sci., 65: 2213-2227.
- FANGER, P.O., 1970. Conditions for thermal comfort introduction of a general comfort equation. In: Hardy, J.D., Gagge, A.P., Stolwijk, J.AJ. Physiological and behavioral temperature regulation. London: Charles C. Thomas Publisher, pp.152-176.
- HUBER, J.T., 1989. Relação entre nutrição e "stress" térmico em gado leiteiro. In: Simpósio sobre Produção Animal, VI, Piracicaba, 1989. Anais. Piracicaba, FEALQ, pp.63-65.
- MÜLLER, P.B., 1989. Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos. Editora Sulina, Porto Alegre, 262 p.
- WIERSMA, F. e ARMSTRONG, D.V., 1983. Cooling dairy cattle in the holding pen. ASAE paper 83-4507.

## PORTUGUESE CONSUMER PREFERENCES FOR TURKEY MEAT COLOR AND TYPE OF PACKAGE

M.J. FRAQUEZA, A.S. CARDOSO, M.C. FERREIRA e A.S. BARRETO

Faculdade de Medicina Veterinária. CIISA. Universidade Técnica de Lisboa. Av. da Universidade Técnica, Polo Universitário, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal.  
e-mail: mjoaofraqueza@fmv.utl.pt

(Recepção: 24 de Maio de 2005; Aprovação: 29 de Julho de 2005)

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the importance of the color of sliced turkey meat and type of package on consumer preferences. The influence of different gas mixtures composition of modified atmosphere package (MAP) inducing changes in meat color and related consumer preferences during meat purchasing was evaluated. The importance of others extrinsic attributes as price, rastreability and label on the moment of purchasing meat was quantified. Consumers were questioned about the influence of shop confidence and personal sale attendance on meat purchasing act. Consumers have different preferences related to turkey meat color. They preferred slightly pink color turkey meat characterized by a  $pH_{24}=5,85$ ,  $L_{24}=46,68$ ,  $a_{24}=4,45$ ,  $b_{24}=-1,07$  than a pale or dark pink meat color. This preference could be related to a previous experimented quality of meat. The shop confidence has more influence in turkey meat purchasing act than its origin or label. 57% of consumers have no confidence on sliced turkey meat package under modified atmosphere preferring the traditional package (aerobic condition) for meat. The fact that consumers have no information about the advantages of meat under modified atmosphere package associated to a habit of purchasing meat under traditional package are the reasons of this preference. When meat is under modified atmosphere package with a gas composition of  $CO_2$ ,  $N_2$  and  $CO$ , the bright pink meat color was preferred than the brown or gray meat color induced by an anoxic gas composition used in package.

**Key-words:** Color, consumers, MAP, turkey meat

### ESTUDO DAS PREFERÊNCIAS DOS CONSUMIDORES PORTUGUESES EM RELAÇÃO À COR DA CARNE DE PERU E TIPO DE EMBALAGEM UTILIZADA

#### RESUMO

Este estudo teve por objectivo quantificar a importância do atributo cor da carne de aves, particularmente da carne de peru, nas preferências dos consumidores portugueses

e bem assim o tipo de embalagem utilizado. Foi avaliado o efeito do tipo de mistura de gases que, por induzir alterações da cor na carne embalada, influencia a aquisição da carne de peru. A importância de outros atributos extrínsecos, para além da embalagem, como o preço, a origem e a marca, no acto de compra, também foi quantificada. Foi questionada a influência da confiança no estabelecimento e do atendimento personalizado no acto de compra. A cor da carne de peru influencia o acto de compra. Os consumidores preferiram a carne de peru de cor rosa intermédia, caracterizada pelos parâmetros  $pH_{24}=5,85$ ,  $L_{24}=46,68$ ,  $a_{24}=4,45$ ,  $b_{24}=-1,07$ , a uma cor rosa pálida ou escura da carne. A preferência do consumidor por determinada cor dos escalopes de peru pode resultar de uma relação com a qualidade experimentada. Mais do que a origem ou a marca da carne, a confiança no estabelecimento de venda influencia a compra da carne de peru. Os escalopes de peru embalados em atmosfera modificada não inspiram uma maior confiança a 57% da população estudada que, maioritariamente, diz preferir a carne embalada em aerobiose. O facto dos consumidores não estarem informados sobre os benefícios qualitativos da embalagem em atmosfera modificada, aliado aos hábitos de apresentação e consumo, pode estar na origem da preferência em relação à embalagem em aerobiose. Quando a carne de peru é embalada em atmosfera modificada com uma mistura de gases contendo  $CO_2$ ,  $N_2$  e  $CO$ , apresenta cor rosa vivo sendo preferida em relação à carne com uma tonalidade mais acastanhada ou cinza/bege resultante da sua exposição a misturas de gases anóxicas.

**Palavras-chave:** carne de peru, consumidores, cor, embalagem em atmosfera modificada

## INTRODUÇÃO

O conceito de qualidade da carne tem evoluído nos últimos anos e, para além da percepção sensorial, o consumidor no acto de compra considera novos atributos. Entre os novos atributos extrínsecos são referidos a marca do produto, o preço, a garantia da sua origem (rastreabilidade), a embalagem, as menções de rotulagem e a informação disponível sobre a produção e a certificação dos sistemas de gestão de segurança e qualidade (Bernués *et al.*, 2003a, b; Bredahl *et al.*, 2003). A cor da carne relacionada com a sua aparência continua a ser um dos atributos intrínsecos mais importantes podendo influenciar a preferência do consumidor no local de venda.

A qualidade intrínseca da carne é influenciada por complexas interações de uma variedade de factores genéticos e ambientais, do manejo dos animais antes e durante o abate e das carcaças após o abate. A estreita relação entre estes factores torna difícil determinar a contribuição individual de cada um deles nas características intrínsecas da carne. Mas, correspondendo estas a atributos qualitativos exigidos pelos consumidores, os produtores e industriais deverão dar-lhes a devida atenção

assegurando o controlo de factores de melhoria durante a produção, transformação e distribuição da carne.

Nas aves, a ocorrência de vários fenómenos anormais na transformação *postmortem* do músculo em carne, dão origem a alterações qualitativas semelhantes às da carne de porco com o aparecimento de carnes pálidas ditas PSE (Pale, Soft and Exsudative) (Santé *et al.*, 1995; McKee e Sams, 1998; Dransfield e Sosnicki, 1999). Os factores que induzem estes fenómenos poderão ser intrínsecos e extrínsecos ao animal, existindo ainda, muitas dúvidas por esclarecer (Sams, 1999; Abeyesinghe *et al.*, 2001; Alvarado *et al.*, 2002).

Vários autores estabeleceram categorias qualitativas de carne de peru com base na sua cor, valor de pH e capacidade de retenção de água (Barbut, 1996, 1997; McCurdy *et al.*, 1996; Sams, 1999; Owens *et al.*, 2000, Fraqueza *et al.*, 2001). Associada a estas características, ocorrem variações no estabelecimento de prazos de validade da carne de peru embalada em aerobiose e em atmosfera modificada (Allen *et al.*, 1997; 1998; Fraqueza *et al.*, 2000; 2005).

A embalagem em atmosfera modificada permite aumentar o período de validade da carne, melhorar a sua apresentação, facilitar a distribuição, venda e utilização, mantendo a segurança (Taylor, 1996). Existe, contudo, pouca informação sobre a preferência deste tipo de embalagem em carne de aves nos consumidores portugueses.

Sendo a carne de aves bastante popular, como se conclui da análise dos índices de consumo no nosso país (Mendes, 2002), foi nosso objectivo quantificar a importância da cor da carne, em particular, de peru, bem como o tipo de embalagem utilizado, como atributos intrínseco e extrínseco nas preferências dos consumidores portugueses. Por induzir alterações da cor na carne embalada, foi avaliada a influência do tipo de mistura de gases na aquisição da carne de peru. A importância de outros atributos extrínsecos para além da embalagem como o preço, a origem, a marca, a confiança no estabelecimento e o atendimento personalizado no acto de compra também foi quantificada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População inquirida

O inquérito foi realizado a um total de 254 indivíduos, de ambos os sexos, compradores habituais de carne.

### **O Inquérito**

Foram elaboradas perguntas relacionadas com o hábito e a frequência de consumo da carne de peru. A influência de atributos intrínsecos como o aspecto relacionado com a cor e presença de líquido exsudado na embalagem e de atributos extrínsecos como a embalagem, preço, origem, marca, confiança no estabelecimento, atendimento personalizado, no acto de compra foi questionada, quantificando-se o grau de importância de cada um. Receberam-se respostas a questões sobre a preferência da cor da carne de peru, apresentando-se aos inquiridos as amostras de carne previamente seleccionadas pela cor e procedendo-se, do mesmo modo, para avaliar a preferência do tipo de embalagem (aerobiose ou atmosfera modificada). Foi questionada a preferência pela carne embalada em função de diferentes misturas de gases usadas.

A importância do tipo de embalagem no grau de confiança do consumidor também foi inquirido, assim como a disposição para aceitar um acréscimo no valor de compra da carne como consequência de atributos qualitativos implícitos, devidos ao tipo de embalagem utilizada, tais como a integridade, a melhor rastreabilidade e o aumento do prazo de validade do produto.

No final, efectuaram-se questões pessoais para se proceder à caracterização sócio económica da amostra de população inquirida. As questões efectuadas foram fechadas, utilizando-se escalas de pontuação entre 1 e 5 para medir o grau de preferência dos consumidores. O questionário foi previamente testado, modificado e melhorado.

### **Condições de realização do inquérito**

O inquérito foi efectuado através de entrevista pessoal em dois dias consecutivos (23 e 24 de Janeiro de 2003), junto à secção de exposição do talho de um hipermercado, na zona de Lisboa, durante o seu horário normal de funcionamento. As amostras de carne que foram observadas nas perguntas números 5 e 6 no inquérito, foram dispostas numa das prateleira do expositor refrigerado a 0-3 °C e iluminadas com lâmpada fluorescente (36w/76) de intensidade luminosa média de 1327 lux.

### **Colheita e selecção das amostras de carne utilizadas no inquérito**

As amostras foram colhidas de carcaças de peru, abatidos em condições comerciais de abate num matadouro industrial. A selecção das amostras e avaliação da qualidade da carne foi efectuada pela medição do pH<sub>24</sub> (24 h *postmortem*) e da

cor (às 24 h *postmortem*), de acordo com os critérios estabelecidos por Fraqueza *et al.* (2001). Na medição do pH utilizou-se um eléctrodo de perfuração (FC 230B, HANNA Instruments, Itália) ligado a um potenciómetro portátil (HI9023, Hanna Instruments, Itália), de acordo com NP-3441 (1990). A cor do músculo *Pectoralis major* foi avaliada pela medição dos parâmetros **L**, **a** e **b** do sistema de cor CIELab (Hunt *et al.*, 1991) na superfície da face interna da amostra com um colorímetro Chroma Meter CR-300 (Minolta, Japão). As amostras seleccionadas apresentaram as seguintes características: amostra A, de cor clara, com  $pH_{24}=5,78$ ,  $L_{24}=50,17$ ,  $a_{24}=4,96$ ,  $b_{24}=-1,08$ ; amostra B, de cor intermédia, com  $pH_{24}=5,85$ ,  $L_{24}=46,68$ ,  $a_{24}=4,45$ ,  $b_{24}=-1,07$ ; amostra C, de cor escura, com  $pH_{24}=5,84$ ,  $L_{24}=44,21$ ,  $a_{24}=4,79$  e  $b_{24}=-1,58$ .

Dos músculos do peito correspondentes às três classes de cor definidas, foram efectuados escalopes numa sala de desmancha, de acordo com as condições do matadouro. A carne fatiada foi colocada num saco de polietileno e transportada em caixa isotérmica para o laboratório, em menos de uma hora.

### Condições de embalagem das amostras

As amostras de carne fatiada das diferentes categorias de cor (clara, intermédia e escura) foram embaladas individualmente em aerobiose (utilizando barquetes de polipropileno Tecknopack plastics, S/L, Barcelona), envolvidas por película estirável de policloreto de vinilo (PVC, permeável ao oxigénio).

Amostras fatiadas dos músculos dum peito de peru classificado como sendo de cor intermédia ( $pH_{24}=5,85$ ,  $L_{24}=46,68$ ,  $a_{24}=4,45$ ,  $b_{24}=-1,07$ ) foram embaladas em MAP numa máquina EVT-7-CD (Tecnoprip, Barcelona), após obter um vazio de 97% e uma entrada de gás de 60% com as misturas: 50%CO<sub>2</sub>, 0,5%CO, 49,5%N<sub>2</sub> (MAP-CO), 50%CO<sub>2</sub>, 50%N<sub>2</sub> (MAP-CO<sub>2</sub>) e 50%Ar, 50%CO<sub>2</sub> (MAP-Ar). Nas embalagens da carne em atmosfera modificada com as diferentes misturas de gases, utilizaram-se barquetes de polipropileno rígido (Tecknopack plastics, S/L, Barcelona) e sacos polilaminados “HBX-070” (R.Bayer, Alemanha), de alta impermeabilidade ao O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (permeabilidade: O<sub>2</sub>=8,3 cm<sup>3</sup>, CO<sub>2</sub>=23 cm<sup>3</sup>, N<sub>2</sub>=3 cm<sup>3</sup> e ao vapor de água=1,3 cm<sup>3</sup>).

### Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi efectuado com o programa SPSS 11.5, tendo-se construído gráficos de frequências (Pestana e Gageiro, 2003).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 254 inquéritos foram efectuados a uma população que se revelou maioritariamente feminina (82,3%, Fig. 1A), apresentando mais de 50% dos inquiridos uma idade compreendida entre os 31 e 50 anos (Fig. 1B), embora estejam representados na amostra indivíduos de todas as faixas etárias compreendidos entre 20 e mais de 60 anos. Os inquiridos residiam na área urbana do distrito de Lisboa. O nível de formação profissional da população inquirida (Fig. 2), dividido em três categorias alto, médio e baixo, foi deduzido pela respectiva actividade profissional, representando uma distribuição equitativa (32 a 35%) de cada categoria.

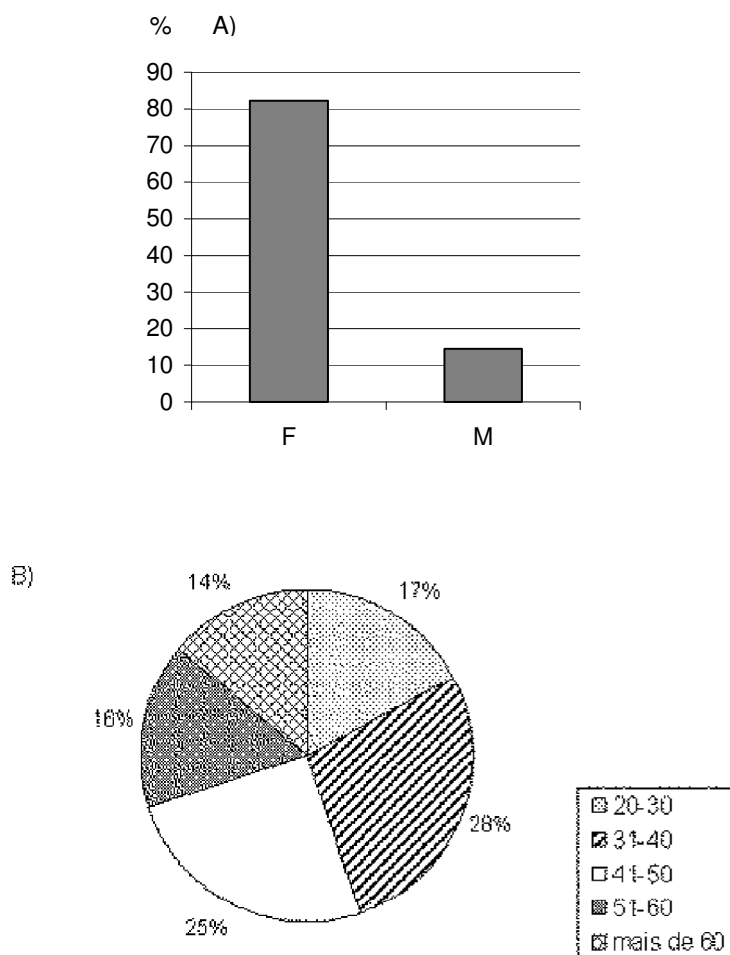


Figura 1. Sexo (A) e idade (B) da população inquirida.

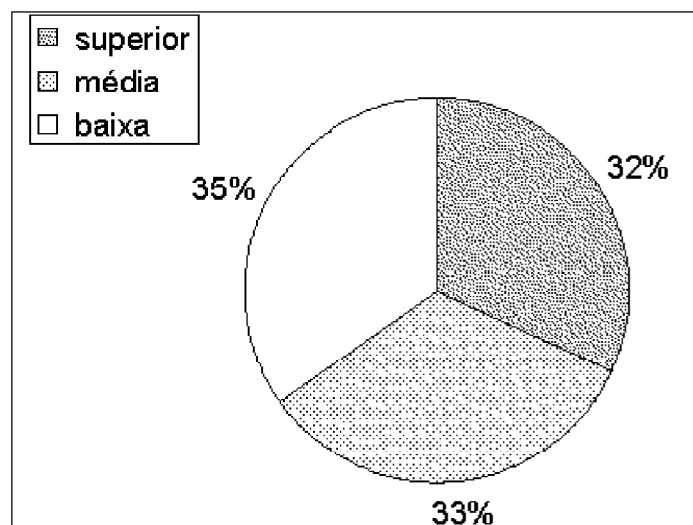


Figura 2. Nível de formação profissional.

Habitualmente, 80% da população global inquirida escolhe, adquire e consome “bifes” de peru (Fig. 3). Relacionando esta questão com o sexo da população inquirida, pode-se concluir serem as mulheres quem habitualmente compra carne de peru. Aproximadamente 11% dos indivíduos não adquire escalopes de peru, dos quais a maioria (7,5%) justificou a sua atitude dizendo que não aprecia a carne de peru, pelo seu sabor e porque é seca (Fig. 4).

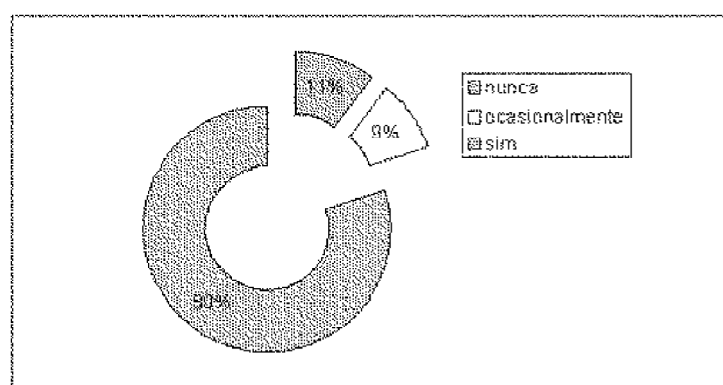


Figura 3. Pergunta nº1: Costuma ser o próprio a adquirir bifes de peru?

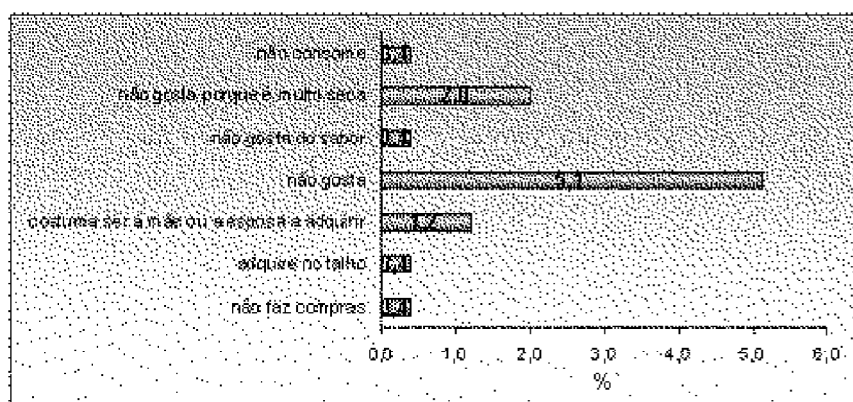


Figura 4. Justificação dos inquiridos à não aquisição da carne de peru.

Entre os indivíduos consumidores de escalopes de peru, a frequência de consumo é elevada: 20% dos inquiridos consome 2 a 3 vezes por semana, enquanto 39% consome uma vez por semana (Fig. 5). Estes resultados vão de encontro aos elevados valores de consumo *per capita* de carne de peru registados nos últimos anos, de 5,5 kg (Mendes, 2002).

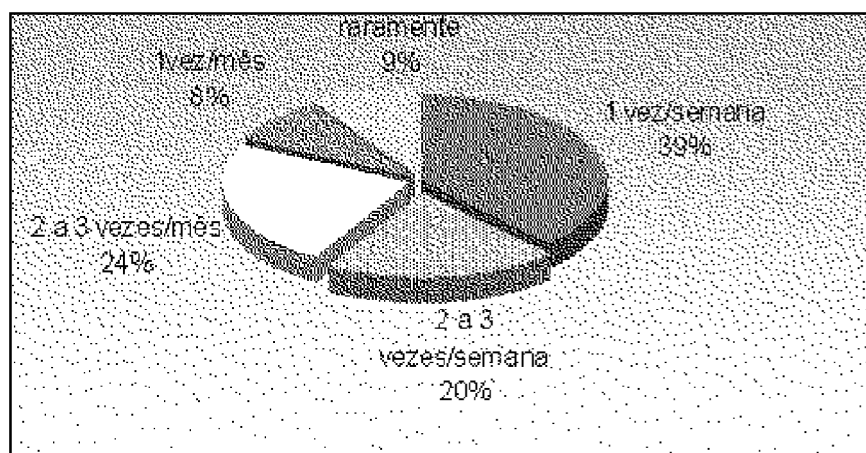


Figura 5. Pergunta nº2: Com que frequência consome bifes de peru?

Os consumidores que adquirem escalopes de peru, são influenciados pela frescura e aspecto da carne (este relacionado com a cor e presença de líquido na

embalagem) (Figs 6 e 7). Foi atribuída uma nota média máxima a estes atributos de 4,8 e 4,7, respectivamente, o que demonstra serem atributos dificilmente dissociáveis pelos inquiridos. O aspecto determina o modo como os consumidores percebem a qualidade e influencia o seu comportamento no acto de compra (Ressurreccion *et al.*, 2004). A frescura é um dos atributos de grande importância no acto de compra que tem sido relacionada com o conceito de segurança (Henson e Northen, 2000).

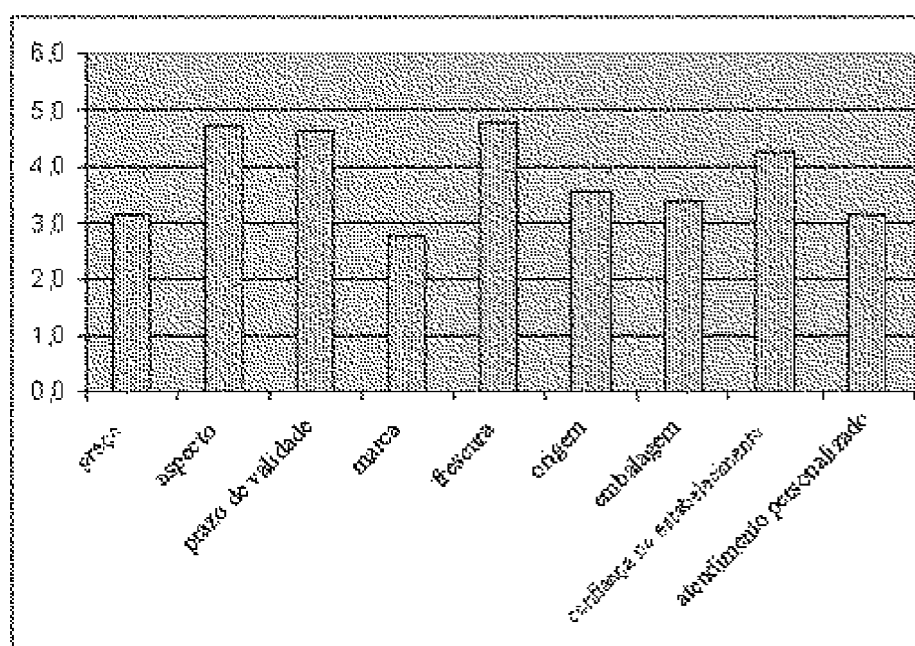


Figura 6. Pergunta nº3: No acto da compra, como classifica a importância dos seguintes factores de escolha, recorrendo a uma escala de 1 a 5? Nota média atribuída aos factores de escolha da carne no acto de compra.

O prazo de validade da carne assume, também, importância significativa no acto de compra, estando ligado ao conceito de frescura, mas também à capacidade de armazenamento do produto. É interessante notar que mais do que a origem ou a marca da carne, a confiança no estabelecimento de venda influencia a compra da carne de peru. Em relação ao atendimento personalizado, 45% da população inquirida atribuiu pontuações 4 e 5 a este factor, indicando que tem influência no acto de compra (Fig. 7).

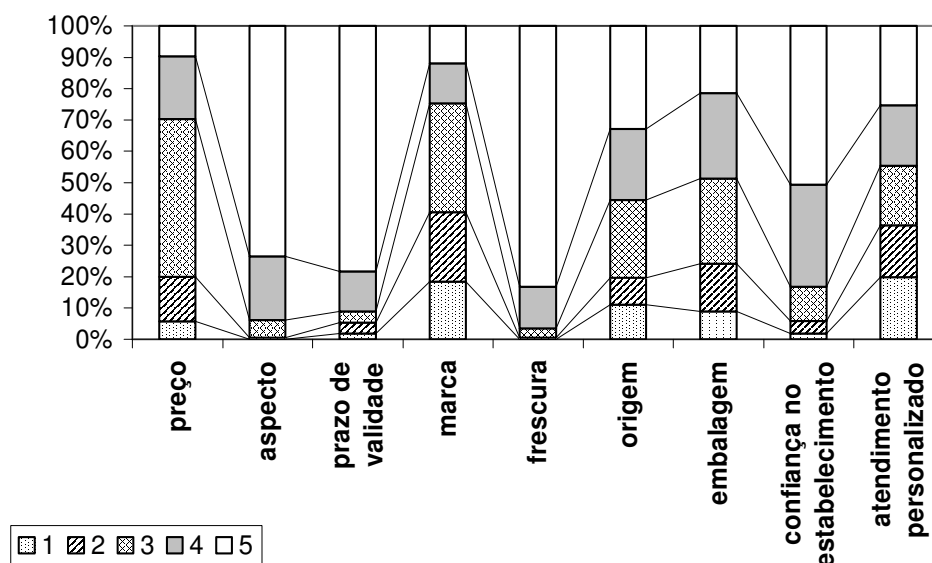


Figura 7. Pergunta nº3: No acto da compra, como classifica a importância dos seguintes factores de escolha, recorrendo a uma escala de 1 a 5? Frequência da pontuação atribuída a cada um dos factores de escolha da carne no acto de compra.

A origem da carne de peru tem uma importância média como atributo extrínseco influenciador do acto de compra. Pelo contrário, Bernués *et al.* (2003<sup>a</sup>, 2003<sup>b</sup>) referem que em relação à carne de bovino e de carneiro em países, como a Inglaterra, Espanha, Itália e França é muito valorizada a origem, os sistemas de produção e a rastreabilidade. A origem da carne de vaca surge para os consumidores como uma garantia de segurança, enquanto não parece estar estabelecida esta relação na carne de peru pelo que a importância desta característica no momento de compra é menor. Os mesmos autores referem que a marca, pelo contrário, tem pouca importância para a maioria dos consumidores quando adquirem carne, verificando-se que é prestada pouca importância ao intermediário ou distribuidor como uma fonte de informação de qualidade do produto.

A embalagem da carne apresentou uma influência média de 3,4 no acto de compra. Este atributo de conveniência não tem muita influência no acto de compra da carne de peru. O facto do consumidor estar habituado a comprar carne não embalada, sem estar ligada a qualquer marca e origem pode explicar os resultados

obtidos em relação à diminuta importância destes atributos e à relevância que é prestada à confiança no estabelecimento de venda.

O preço da carne de peru é um factor de decisão que tem uma influência média (50% da população atribuiu nota 3, Fig. 7). No entanto, 30% dos indivíduos atribuíram notações superiores a 4. Dado que a carne de peru é, em geral, mais barata do que a de outros animais de talho, o preço pode exercer menor importância no acto de compra desta carne quando dois produtos, com características idênticas, são oferecidos ao consumidor.

Atendendo a que o aspecto da carne de peru influencia, de uma forma marcada, o consumidor no acto de compra, como tem sido assinalado por diversos autores em relação à carne de outras espécies (Bredahl *et al.*, 2003; Grunert *et al.*, 2004), e que intrinsecamente ligada ao aspecto, a cor tem influência na escolha, pode-se observar na Fig. 8 que a carne de peru de cor intermédia (ligeiramente rosada) é a preferida por 41% dos consumidores, seguindo-se a carne de cor clara (rosa pálido) (35%). Os bifes de peru de cor escura (rosa escuro) tiveram a preferência de apenas 24% da população inquirida.

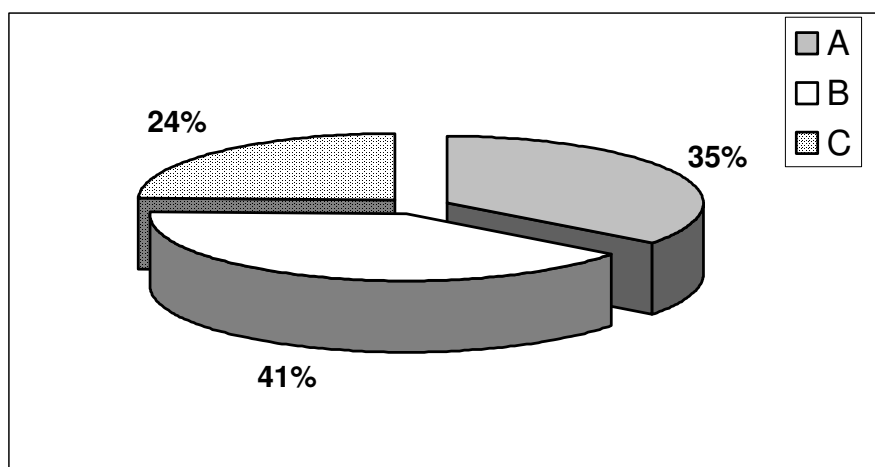


Figura 8. Pergunta nº4: Destas 3 amostras qual escolheria, tendo em conta a cor da carne?

Amostra A= cor clara; Amostra B= cor intermédia; Amostra C= cor escura.

É importante realçar que a maioria dos inquiridos consome pelo menos uma vez por semana bifes de peru que adquiriram no local de venda, preferindo carne de cor intermédia.

Bredahl *et al.* (2003<sup>a</sup>, 2003<sup>b</sup>) e Grunert *et al.* (2004) verificaram que a cor da carne de porco e vaca é um atributo qualitativo intrínseco, muito bem relacionado com a qualidade esperada pelos consumidores. A cor da carne de frango é referida como um atributo intrínseco de grande importância no acto de compra, surgindo como um indicador de qualidade e frescura (Kennely *et al.*, 2005).

Uma vez que a escolha da carne de peru recai sobre a carne de cor intermédia pode existir relação desta característica com a qualidade esperada e, eventualmente, com a experimentada pelos consumidores, apesar da relação entre a qualidade esperada e a experimentada ser limitada (Grunert *et al.*, 2004).

A carne escura de peru apresenta contagens de microrganismos totais mais elevadas do que as restantes categorias de cor após um período de armazenamento, sendo evidenciados mais precocemente os sinais de alteração organoléptica (Fraqueza *et al.*, 2002, 2005; Allen *et al.*, 1997, 1998). Por outro lado, a carne clara (rosa pálida) apresenta maior perda à cozedura (Fraqueza *et al.*, 2001), podendo tornar-se, após tratamento culinário, mais seca. A preferência do consumidor por determinada cor dos escalopes de peru pode resultar de uma relação com a qualidade experimentada, associando a cor da carne ao estado de frescura, período de validade e características organolépticas.

Quando questionada sobre preferência no tipo de embalagem da carne, aerobiose ou atmosfera modificada (MAP), 56% da população consumidora de escalopes de peru preferiu a carne embalada em aerobiose (Fig. 9).

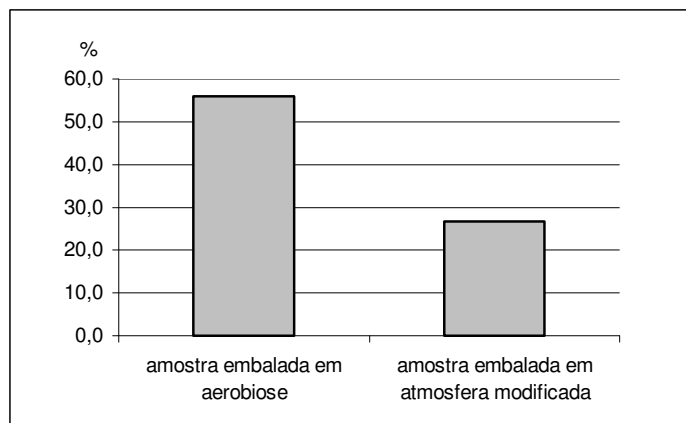


Figura 9. Pergunta nº 5: Entre estes 2 tipos de embalagem (aerobiose e MAP), qual escolheria?

Independentemente do facto de apreciarem ou não a carne embalada em MAP, quando inquirida sobre a preferência da carne dentro de embalagens com

misturas atmosféricas diferentes, pode-se concluir da análise da Fig. 10 que 52% da população prefere em primeiro lugar os escalopes de peru embalados com a mistura MAP-CO, que confere uma cor rosada viva à carne, tal como é referido por vários autores (Fraqueza *et al.*, 2000; Sørheim *et al.*, 2004). Em segundo lugar de preferência, surgem os bifes embalados em MAP-CO<sub>2</sub> (38%) e, em terceiro lugar, os embalados em MAP-Ar (31%). Estes dois últimos tipos de mistura de gases, tornam a carne de peru dentro da embalagem mais acastanhada ou cinza/bege, pelo que pode ser esta a razão da menor preferência, à semelhança do que acontece com outros tipos de carne embaladas com misturas atmosféricas anóxicas ou a vácuo (Taylor, 1996).

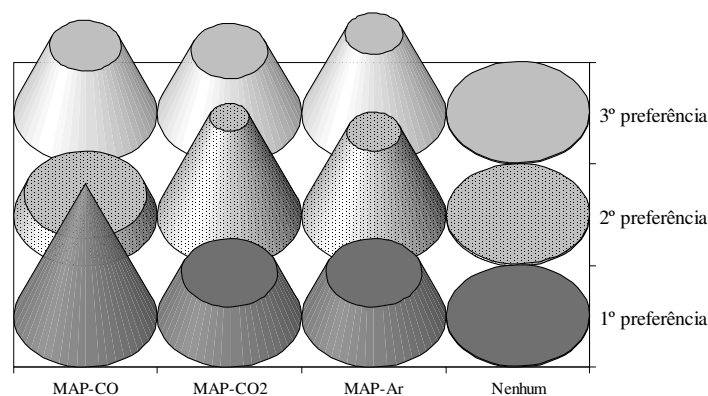


Figura 10. Pergunta nº 6: Dentro das embalagens tipo B, ordene-as por ordem de preferência? MAP-CO= 50%CO<sub>2</sub>, 0,5%CO, 49,5%N<sub>2</sub>; MAP-CO<sub>2</sub>= 50%CO<sub>2</sub>, 50%N<sub>2</sub> e MAP-Ar= 50%Ar, 50%CO<sub>2</sub>

Os escalopes de peru embalados em MAP não inspiram mais confiança a 57% dos inquiridos (Fig. 11), que maioritariamente preferem carne embalada em

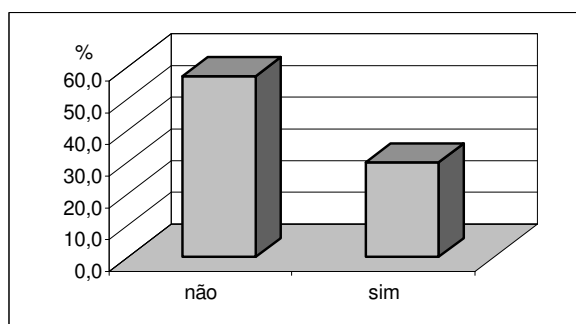


Figura 11. Pergunta nº7: Os bifes de peru acondicionados nas embalagens do tipo B (MAP) inspiram mais confiança?



aerobiose. Merece atenção que cerca de 70% dos indivíduos que escolhem a carne embalada em MAP têm uma alta confiança (notações 4 e 5) neste tipo de embalagem (Fig. 12).

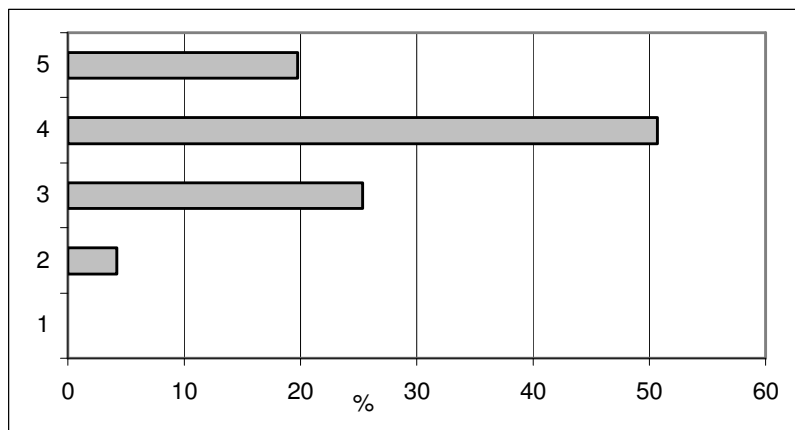


Figura 12. Grau de confiança inspirado pela embalagem MAP na população que afirmou ter confiança neste tipo de embalagem.

Quando a embalagem MAP foi relacionada com uma maior integridade, uma melhor rastreabilidade e um aumento do prazo de validade da carne é interessante notar que quase 60% da população está disposta a suportar este tipo de embalagem, quando em pergunta anterior preferia a embalagem da carne em aerobiose (Fig. 13).

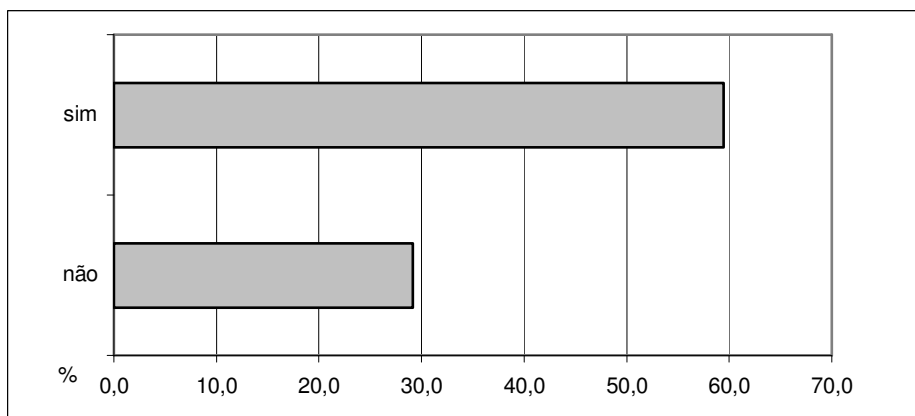


Figura 13. Pergunta nº8: "Este tipo de embalagem garante maior integridade, melhor rastreabilidade e aumenta o prazo de validade do produto". Se a utilização deste tipo de embalagem garante estes pressupostos, estaria disposto a pagar algo mais por ela?

O facto dos consumidores não estarem informados sobre os benefícios qualitativos da embalagem MAP, associado aos hábitos de apresentação e do consumo da carne pode estar na origem da preferência em relação à embalagem em aerobiose. Os benefícios não foram reconhecidos quando a carne embalada em atmosfera modificada foi apresentada, porque os inquiridos não tiveram prévio acesso a esta informação. Isto ilustra como o conceito de qualidade pode ser compreendido de modo diferente pelo produtor, vendedor e consumidor e como a falta de informação pode influenciar a preferência deste.

Bernués *et al.* (2003<sup>b</sup>) referem que a evidência de informação sobre atributos dos sistemas de produção que os consumidores não podem avaliar ou verificar, requer uma rotulagem apropriada e a implementação de acções promocionais, mas também uma certificação de produto independente e credível, de modo a assegurar aos consumidores as especificações qualitativas oferecidas pelo produto. Para um maior sucesso na introdução de embalagem MAP na carne de peru, torna-se necessário desenvolver junto dos consumidores acções de esclarecimento, para criar uma imagem do produto ligada a atributos produtivos como o maior prazo de validade e a melhor rastreabilidade.

## CONCLUSÕES

A carne de peru de cor intermédia (ligeiramente rosada) caracterizada pelos parâmetros  $pH_{24}=5,85$ ,  $L_{24}=46,68$ ,  $a_{24}=4,45$ ,  $b_{24}=-1,07$  é a preferida por 41% dos consumidores, seguindo-se a carne de cor clara (rosa pálido) (35%). Os bifes de peru de cor escura (rosa escuro) tiveram a preferência de apenas 24% da população inquirida. A preferência do consumidor por determinada cor dos escalopes de peru pode resultar de uma relação com a qualidade experimentada, associando a cor da carne ao estado de frescura, período de validade e características organolépticas. A maioria dos consumidores preferem escalopes de peru de cor rosada mais clara do que escura.

Os escalopes de peru embalados em atmosfera modificada não inspiram uma maior confiança a 57% da população, que maioritariamente refere preferir a carne embalada em aerobiose. O facto dos consumidores não estarem informados sobre os benefícios qualitativos da embalagem MAP, associado aos hábitos de apresentação e consumo de carne pode ser a origem da preferência em relação à embalagem em aerobiose. Quando embalada em atmosfera modificada com uma mistura de gases contendo CO, a carne de peru de cor rosa vivo é preferida em

relação à carne com uma tonalidade mais acastanhada ou cinza/bege, resultante da sua exposição a misturas de gases anóxicas.

### **AGRADECIMENTOS**

A todos os que contribuíram para a realização deste trabalho expressamos o nosso agradecimento, em particular, ao Jumbo de Alfragide pela cedência do espaço e disponibilidade das equipas, à Direcção de Qualidade do Grupo Auchan pelo contacto disponibilizado, bem como às técnicas Maria Helena Fernandes, Paula Carapinha dos Santos e Maria José Fernandes pela colaboração prestada na realização dos inquéritos.

### **BIBLIOGRAFIA**

- ABEYESINGHE, S.M., WATHES, C.M., NICOL, C.J. e RANDALL, J.M., 2001. The aversion of broiler chickens to concurrent vibrational and thermal stressors. *Applied Animal Behaviour Sci.*, 73:199-215.
- ALLEN, C.D., RUSSELL, S.M. e FLETCHER, D.L., 1997. The relationship of broiler breast color and pH to shelf life and odor development. *Poultry Science*, 76:1042-1046.
- ALLEN, C.D., FLETCHER, D.L., NORTHCUTT, J.K. e RUSSELL, S.M., 1998. The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf life. *Poultry Sci.*, 77:361-366.
- ALVARADO, C.Z. e SAMS, A.R., 2002. The role of carcass chilling rate in the development of pale, exudative turkey pectoralis. *Poultry Sci.*, 81:1365-1370.
- BARBUT, S., 1996. Estimates and detection of the PSE problem in young turkey breast meat. *Can. J. Anim. Sci.*, 76:455-457.
- BARBUT, S., 1997. Occurrence of pale soft exudative meat in mature turkey hens. *British Poultry Science*, 38:74-77.
- BERNUÉS, A., OLAIZOLA, A. e CORCORAN, K., 2003a. Extrinsic attributes of red meat as indicators of quality in Europe: an application for market segmentation. *Food Quality and Preference*, 14:265-276.
- BERNUÉS, A., OLAIZOLA, A. e CORCORAN, K., 2003b. Labeling information demanded by European consumers and relationship with purchasing motives, quality and safety of meat. *Meat Sci.*, 65:1095-1106.
- BREDAHL, L., 2003. Cue utilisation and quality perception with regard to branded beef. *Food Quality and Preference*, 15:65-75.
- DRANSFIELD, E. e SOSNICKI, A.A., 1999. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *Poultry Sci.*, 78:743-746.
- FRAQUEZA, M.J., FERREIRA, M.F., OUAKININ, J.S. e BARRETO, A.S., 2000. Effect of Carbon Monoxide and Argon in sliced turkey meat under modified atmosphere packaging (preliminary assays).

- Proc. 46<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology, "Meat Diversifies Meals", Buenos Aires, Argentina, pp. 760-761.
- FRAQUEZA, M.J., FERREIRA, M.F., OUAKININ, J.S. e BARRETO, A.S., 2001. Evaluation of turkey meat quality at a commercial Portuguese slaughterhouse. Proc. 47<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology, Kraków, Poland, pp. 168-169.
- FRAQUEZA, M.J., FERREIRA, M.F., OUAKININ, J.S. e BARRETO, A.S., 2002. Microbial evaluation of sliced turkey meat with different colour quality. Proc. 48<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology, 25-30 August, Roma, pp. 326.
- FRAQUEZA, M.J., FERREIRA, M.C. e BARRETO, A.S., 2005. Shelf life of different colour breast turkey meat under modified atmosphere package. Proc. 51<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology, ICoMST. Baltimore, Maryland, USA.
- GRUNERT, K.G., BRED AHL, L. e BRUNSØ, K., 2004. Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector- a review. *Meat Sci.*, 66:259-272.
- HENSON, S. e NORTHEN, J., 2000. Consumer assessment of the safety of beef at the point of purchase: a pan-European study. *J. Agricultural Economics*, 51(1):90-105.
- HUNT, M.C., ACTON, J.C., BENEDICT, R.C., CALKINS, C.R., CORNFORTH, D.P., JEREMIAH, L.E., OLSON, D.G., SALM, C.P., SAVELL, J.W. e SHIVAS, S.D., 1991. Guidelines for meat color evaluation. American Meat Science Association, USA.
- KENNEDY, O.B., STEWART-KNOX, B.J., MITCHELL, P.C. e THURNHAM, D.I., 2005. Flesh colour dominates consumer preference for chicken. *Appetite*, 44:181-186.
- MCCURDY, R.D., BARBUT, S. e QUINTON, M., 1996. Seasonal effect on pale soft exudative (PSE) occurrence in young turkey breast meat. *Food Research International*, 29(3-4):363-366.
- McKEE, S.R. e SAMS, A.R., 1998. Rigor mortis development at elevated temperatures induces pale, exudative turkey meat characteristics. *Poultry Science*, 77:169-174.
- MENDES, M.L.S., 2002. Anuário Pecuário. Aves e Ovos. 1- Mercado Nacional. 2- Mercado Comunitário. Coordenado por Mendes, M.L.S.. Gabinete de Planeamento e Política Agro-Alimentar. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Ed.Castel-Publicações e Edições, SA, pp. 202-236.
- Norma Portuguesa NP-3441, 1990. Carnes, derivados e produtos carneos. Determinação do pH. Processo de referência. Instituto Português de Qualidade, Lisboa.
- Owens, C.M., Hirschler, E.M., McKee, S.R., Martinez-Dawson, R. e Sams, A.R., 2000. The characterization and incidence of pale, soft, exudative turkey meat in a commercial plant. *Poultry Science*, 79:553-558.
- PESTANA, M.H. e GAGEIRO, J.N., 2003. Análise de dados para ciências sociais. A complementaridade do SPSS. 3<sup>a</sup> ed. Edições Sílabo, Lisboa, pp. 19-41.
- RESSURRECCION, A.V.A., 2004. Sensory aspects of consumer choices for meat and meat products. *Meat Science*, 66(1):11-20.
- SAMS, A.R., 1999. Meat quality during processing. *Poultry Science*, 78:798-803.

- SANTÉ, V., SOSNICKI, A.A., GREASER, M.I., PIETRZAK., M., POSPIECH, E. e OUALI, A., 1995. Impact of turkey breeding and production on breast meat quality. Proc. XII European Symposium on the quality of poultry meat, Zaragoza, pp. 151-156.
- SØRHEIM, O., NISSEN, H., AUNE, T. e NESBAKKEN, T., 2004. Packaging of red meats with carbon monoxide atmospheres. Workshop Carbon monoxide MAP for the red meat and related industries. Food Science Australia, 18 March 2004. Sydney, Austrália.
- TAYLOR, A.S., 1996. Basic considerations in meat packaging. In: Meat quality and meat packaging. Part II. S. Taylor, A. Raimundo, M. Severini, J.M. Smulders (eds.), EC\CE/AMST. Utrecht. Netherlands, pp. 259-271.

## CONSIDERATIONS ON SANITARY SAFETY OF MIXED FEED FOR HORSES

M.M. GUERRA<sup>1</sup>, H. M. MARTINS<sup>2\*</sup>, M. F. GOUVEIA<sup>3</sup> e F. BERNARDO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CIISA – Faculdade de Medicina Veterinária, Pólo Universitário da Ajuda, Rua Prof. Cid dos Santos, 1300-147 Lisboa; <sup>2</sup> Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Serviço de Micologia, Estrada de Benfica 701, 1549-011 Lisboa; <sup>3</sup> Eurocereal, Comercialização de Produtos Agro-Pecuários S.A., Estrada da Avesada, 2665-290 Malveira. correspondência: H.Martins Martins Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Serviço de Micologia, Estrada de Benfica 701, 1549-011 Lisboa; email:marina.martins@lniv.min-agricultura.pt

(Recepção: 7 de Julho de 2005; Aprovado: 29 de Julho de 2005)

### ABSTRACT

The microbiological (mycological analysis, total mesophilic microflora counts, detection of *Salmonella* and *Listeria* spp., sulphite-reducing *Clostridium* spores enumeration and detection of coliforms bacteria) and mycotoxicological (aflatoxins, fumonisins, ochratoxin A and deoxynivalenol) characterisation of 50 samples of mixed feed for horses was undertaken. Forty samples revealed to be contaminated with fungi (80%), at a level of  $3.20 \log_{10}$  cfu/g in average. The moulds most frequently found were those belonging to *Aspergillus*, *Penicillium* and *Mucor* genera. Yeast counting was in average of  $5.76 \log_{10}$  cfu/g. The total mesophilic count was obtained in 33 samples (66%), with an average level of  $3.60 \log_{10}$  cfu/g. *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. were not found in any of the 50 samples. Sulphite reducing *Clostridium* spores were detected in 5 samples (10%) with levels ranging from 1 to  $2 \log_{10}$  cfu/g; coliformes were present in 26 samples (52%). Aflatoxins and Fumonisin were not detected in any sample. Thirty samples were positive for ochratoxin A (60%) and 15 (30%) for deoxynivalenol, which were present in levels ranging from 2 to  $3.2 \mu\text{g/kg}$  and from 100 and  $316 \mu\text{g/kg}$ , respectively.

**Key-words:** horses, mixed feed, microbiology, mycotoxins

## ASPECTOS DA SEGURANÇA SANITÁRIA DOS ALIMENTOS COMPOSTOS PARA CAVALOS

### RESUMO

Neste trabalho procedeu-se à caracterização microbiológica (análise micológica, contagem de microrganismos mesófilos totais, pesquisa de *Salmonella* e de *Listeria* spp., contagem de esporos de *Clostridium* sulfito redutores e pesquisa de bactérias coliformes) e micotoxicológica (aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A e deoxinivalenol) em 50 amostras de alimentos compostos para cavalos. Quarenta amostras

apresentaram contaminação fúngica (80%). O teor médio de bolores foi de  $3,20 \log_{10}$  ufc/g. Os bolores mais frequentes foram os dos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor*. O teor médio de leveduras foi de  $5,76 \log_{10}$  ufc/g. A contagem de microrganismos mesófilos totais revelou teores médios de  $3,60 \log_{10}$  ufc/g em 33 amostras (66%). A pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria* spp. foi negativa nas 50 amostras. Foram encontrados esporos de *Clostridium* sulfito redutores em 5 amostras (10%) com teores médios situados entre 1 e  $2 \log_{10}$  ufc/g; a presença de coliformes foi verificada em 26 amostras (52%). Todas as amostras apresentaram resultados negativos para aflatoxinas e fumonisinas. Relativamente à ocratoxina A, 30 amostras foram positivas (60%), com teores que oscilaram entre 2,0 e  $3,2 \mu\text{g/kg}$ . O deoxinivalenol foi detectado em 15 amostras (30%) com níveis compreendidos entre 100 e  $316 \mu\text{g/kg}$ .

**Palavras-chave:** alimentos compostos, cavalos, micotoxinas, microbiologia

## INTRODUÇÃO

A utilização de equinos em eventos desportivos e exposições públicas conheceu nas últimas décadas um crescimento muito significativo. A valorização económica de alguns exemplares destes animais obriga os criadores e detentores a acautelarem todos os factores de risco que possam por em perigo a vida ou o rendimento destes animais. Entre múltiplas componentes que integram o manejo destes animais, o regime alimentar é um dos mais críticos. O regime alimentar dos cavalos de alto rendimento integra múltiplas componentes forrageiras, de pastagem e suplementações com rações balanceadas. Estes alimentos compostos que, por vezes, servem de veículo às suplementações vitamínicas, aminoácidos e minerais, são basicamente constituídas por cereais, cuja segurança sanitária deve ser controlada com detalhe.

Vários perigos sanitários podem estar associados a este tipo de alimentação. Contudo, merecem destaque os agentes bacterianos patogénicos com tropismo para o aparelho digestivo (cólicas), como *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria* e diversos parasitas (nemátodos e protozoários) (Wilkins, 1994), bem como substâncias contaminantes com toxicidade para diversos compartimentos orgânicos (tubo digestivo, fígado, rim, medula óssea e sistema nervoso central). Entre estas substâncias, destacam-se os metais pesados, os pesticidas e diversas biotoxinas (fitotoxinas e micotoxinas).

Os cereais e as forragens utilizadas na dieta dos cavalos são matrizes nas quais se desenvolvem, durante a fase vegetativa (pré-colheita) e a armazenagem (pós-colheita), diversos agentes fúngicos, alguns dos quais com potencial toxinogénico. A esse desenvolvimento corresponde também uma acentuada perda

de nutrientes, com a consequente desvalorização dietética dos alimentos. As aflatoxinas são sintetizadas por três géneros de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (Kurtzman *et al.*, 1987) e ocorrem sobretudo em cereais (principalmente no milho), subprodutos de cereais e sementes de proteaginosas e oleaginosas (Lacey, 1986). Todas as espécies animais são susceptíveis à acção patogénica das aflatoxinas, embora a severidade dos efeitos varie consideravelmente consoante a espécie, a dose e a frequência de ingestão (Martins e Martins, 2000).

Em equinos, as micotoxinas são sobretudo conhecidas pela capacidade de causar doenças agudas de elevada gravidade. Contudo, no caso de cavalos de desporto e de reprodução, a exposição a doses baixas de micotoxinas pode afectar o desempenho ou a capacidade reprodutiva destes animais, sem que se manifestem sinais clínicos de doença (Newman e Raymond, 2005).

As fumonisinas (FB) são sintetizadas por estirpes pertencentes a três espécies de *Fusarium spp.*: *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. nygamai*. Existem 6 tipos de fumonisinas (FB1, FB2, FB3, FB4, FA1 e FA2) sendo as mais importantes as FB1 e FB2. A sua presença tem sido assinalada em cereais, sobretudo no milho e seus derivados (Miller e Trenholm, 1994). Entre as fumonisinas, a fumonisina B1 é a que predomina na natureza e a que apresenta maior toxicidade.

No grupo das ocratoxinas estão descritos vários tipos de substâncias, sendo a mais comum e a mais tóxica, a ocratoxina A (OTA). Estas toxinas podem ser sintetizadas por várias espécies de fungos filamentosos, entre as quais se destacam as espécies *Penicillium verrucosum*, (frequente em climas frios) e *Aspergillus gr. ochraceus* (mais frequente em regiões tropicais e subtropicais) (Krogh, 1987). As ocratoxinas têm sido encontradas em cereais, com particular incidência na cevada e no arroz, na farinha de amendoim e em alimentos para humanos como: o grão de café, cerveja, vinho, rim de porco e produtos à base de carnes transformadas (Betina, 1989).

As toxinas tricotecenas são produzidas essencialmente por estirpes de *Fusarium tricinatum*, *F. nivale* e, *F. roseum*. Existem cerca de 40 derivados de tricotecenas, mas apenas alguns foram classificados como contaminantes alimentares dos quais se destacam deoxinivalenol (DON), também conhecido por vomitoxina, o nivalenol (NIV), o diacetoxiscirpenol (DAS) e a toxina T2. Deoxinivalenol é o tricoteceno mais comum em géneros alimentícios, em particular nos alimentos para animais (Ueno, 1987).

A realização deste trabalho teve como objectivos fundamentais a pesquisa de bactérias patogénicas entéricas ou seus indicadores (*Salmonella*, *Listeria spp.*, esporos de *Clostridium* sulfito redutores e bactérias coliformes), fungos e algumas



das micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A e deoxinivalenol) mais relevantes para equinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 50 amostras de alimentos compostos para cavalos de diferente proveniência. As amostras foram colhidas assepticamente, acondicionadas em sacos de plástico e transportadas à temperatura ambiente. Todas as análises foram realizadas em duplicado.

### Análise micológica

A contagem e identificação dos agentes fúngicos foram realizadas de acordo com a NP- 3277-2 (2002). A Identificação de bolores foi efectuada com base na observação de características macro e microscópicas (Domsch, *et al.*, 1980).

### Análise bacteriológica

- A contagem de microrganismos mesófilos totais foi efectuada de acordo com a EN ISO 4833:2003.
- A pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi efectuada segundo a NP-2262:1986.
- A pesquisa de *Samonella* spp. foi efectuada de acordo com a EN ISO-6579:2002.
- As amostras foram analisadas de acordo com o protocolo de pesquisa e contagem de *Listeria* spp. anteriormente optimizado (Guerra e Bernardo, 2000).
- A pesquisa de bactérias coliformes foi efectuada de acordo com a NP 2164:1983.

### Análise micotoxicológica

- Aflatoxinas: pesquisaram-se as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (limite de detecção 1 µg/kg) (Diário da República número 3/97 Série I-B).
- Fumonisinas: a metodologia utilizada para determinar a pesquisa de FB1 e FB2 por HPLC, foi efectuada de acordo com Shepard *et al.* (1990).
- Ocratoxina A: a pesquisa de OTA foi efectuado de acordo com Entwistle *et al.* (2000) (limite de detecção de 2 µg/kg).
- Deoxinivalenol: a metodologia utilizada para determinação e quantificação foi a descrita por Cahill *et al.* (1999) (limite de detecção de 100 µg/Kg).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 50 amostras de alimentos compostos para cavalos analisadas, apenas 35 (70%) apresentaram contaminação por bolores (teor médio (M) =  $3,50 \log_{10} \text{ufc/g}$ ), oscilando entre  $2,40 \log_{10}$  e  $4,23 \log_{10} \text{ufc/g}$  (Quadro I). Foram encontradas leveduras em 10% das amostras processadas (M=  $5,76 \log_{10} \text{ufc/g}$ ) (Quadro I). As restantes amostras (20%) não evidenciaram contaminação micológica significativa ( $M < 20 \text{ ufc/g}$ ).

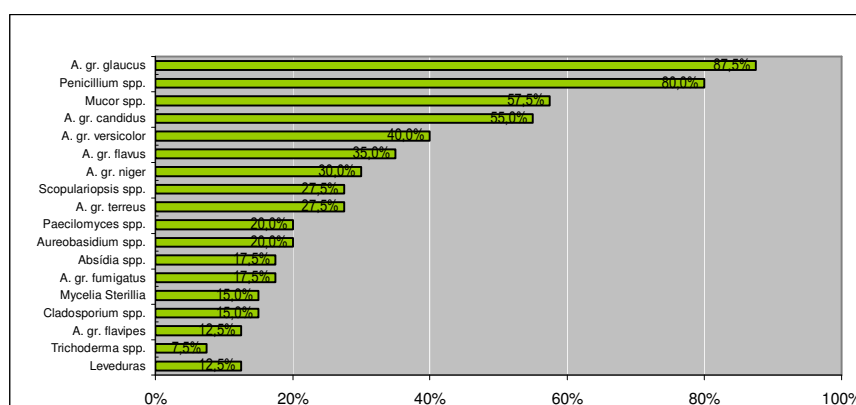


Figura 1 – Frequência (%) dos grupos de fungos isolados ( $N=40$ )

Verificou-se a presença de grupos muito diversificados de bolores perfazendo um total de 10 géneros, estando o género *Aspergillus* representado por 8 grupos (Fig.1). Alguns destes grupos de bolores podem sintetizar micotoxinas em condições favoráveis, entre as quais aflatoxinas e ocratoxinas (Krogh, 1987; Martins e Martins, 2000). A evidência de teores micológicos relativamente baixos e uma micoflora muito diversificada pode indicar que estes alimentos compostos não sofreram biodegradações fúngicas significativas. As dietas podem ainda ter sido submetidas a algum tipo de tratamento fungicida/fungistático e/ou térmico, que pode ter afectado a contaminação fúngica. Adicionalmente, importa referir que o facto de uma amostra não exibir contaminações fúngicas não significa garantia de segurança micotoxicológica, ao contrário dos bolores que sintetizam micotoxinas mas não são resistentes à grande maioria dos tratamentos físicos aplicados aos alimentos (Smith e Moss, 1985). Importa salientar que não existem registos micológicos em alimentos compostos para cavalos na bibliografia pesquisada. Pelo contrário em alimentos compostos para outras espécies pecuárias existe informação que indica

QUADRO I – TEORES MICOLÓGICOS ( $\text{Log}_{10}$  ufc/g) NAS 40 AMOSTRAS CONTAMINADAS DE ALIMENTOS PARA CAVALOS.

Abundância de grupos de fungos (Log <sub>10</sub> ufc/g)																			
Amostra	<i>Penicillium</i> spp.	<i>A. gr. glaucus</i>	<i>A. gr. fumigatus</i>	<i>A. gr. flavipes</i>	<i>A. gr. versicolor</i>	<i>A. gr. terreus</i>	<i>A. gr. candidus</i>	<i>A. gr. flavus</i>	<i>A. gr. niger</i>	<i>Mucor</i> spp.	<i>Absidia</i> spp.	<i>Scopulariopsis</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Aureobasidium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Mycelia Sterilia</i>	Leveduras	Total
1	4,08	3,23	-	-	2,85	-	-	-	-	-	-	2,60	-	-	-	-	2,70	-	4,18
2	4,05	3,15	-	-	2,85	-	-	-	-	-	-	-	2,00	-	-	-	2,30	-	4,13
3	3,97	3,20	-	-	2,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,30	2,30	-	4,06
5	4,07	3,15	-	-	2,60	-	-	-	-	-	-	2,60	-	-	-	-	2,48	-	4,15
6	1,30	2,67	-	-	-	-	1,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,71
7	1,60	2,34	-	-	1,30	1,78	-	-	-	-	-	1,30	-	-	-	-	-	-	2,56
8	2,00	2,49	-	-	-	2,00	1,95	-	-	-	-	1,60	-	-	-	-	-	-	2,81
9	-	2,51	-	-	-	1,78	2,00	-	1,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,70
12	1,78	2,11	-	-	1,70	-	1,30	-	1,00	2,00	1,00	-	-	-	-	1,70	-	-	2,63
13	1,70	2,04	-	-	-	1,30	1,30	1,30	-	2,00	-	-	1,00	-	-	1,70	-	-	2,58
14	2,00	2,60	-	-	-	-	-	-	-	2,30	-	-	-	2,48	-	2,00	-	-	3,04
16	1,30	2,23	-	-	-	1,78	1,60	1,48	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	2,52
17	1,30	2,43	1,60	1,00	-	-	1,85	1,30	-	-	-	-	-	-	1,30	-	-	-	2,65
20	1,85	1,90	-	-	-	-	1,60	1,85	-	2,00	1,30	-	-	-	-	-	-	-	2,58
21	2,30	3,63	-	-	2,00	-	3,51	1,78	1,78	2,00	-	-	1,95	3,15	-	-	-	-	3,98
22	2,30	3,43	-	-	2,00	-	3,36	2,00	2,00	-	-	-	-	2,70	2,00	-	-	-	3,79
23	2,30	3,87	2,00	-	2,30	-	3,46	-	1,48	2,00	-	-	2,00	-	-	-	-	-	4,04
24	2,78	3,45	-	2,00	-	-	4,13	2,00	2,00	2,00	-	-	1,78	-	-	2,30	-	-	4,24
25	2,70	3,59	2,23	-	-	-	3,51	2,30	1,78	1,70	-	-	1,48	2,68	-	2,30	-	-	3,94
26	2,26	2,40	-	-	1,48	-	-	1,48	2,00	1,85	-	-	-	-	-	-	-	-	2,82
27	2,00	2,18	-	1,00	-	-	1,60	1,00	1,30	1,90	-	-	-	-	-	-	-	-	2,61
28	2,20	2,54	-	1,00	-	1,30	1,30	-	1,30	1,30	-	1,60	-	-	2,00	-	-	-	2,87
29	1,90	2,36	-	-	-	1,78	-	-	1,95	1,70	-	1,70	-	-	-	-	-	-	2,75
30	1,70	2,38	1,30	-	-	-	1,48	-	1,30	1,48	-	1,48	-	-	-	-	-	-	2,62
31	1,30	2,30	-	-	1,48	-	1,78	-	-	1,30	-	1,78	-	-	-	-	-	-	2,59
32	1,30	2,18	-	-	1,60	1,60	1,60	-	-	1,48	1,95	1,48	-	1,30	-	-	-	-	2,66
33	-	1,90	-	-	1,48	-	-	-	-	2,04	1,00	-	-	1,30	-	-	-	-	2,40
34	-	2,41	1,30	-	1,30	-	-	-	-	1,85	1,00	1,30	-	-	-	-	-	-	2,60
35	1,30	2,51	1,30	-	1,48	1,78	1,78	1,00	-	1,90	1,60	-	-	1,60	-	-	-	-	2,83
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,53	5,53
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,38	5,38
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,72	5,72
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,98	5,98
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,18	6,18
45	3,83	3,20	-	-	2,70	-	-	-	-	-	-	2,00	-	-	-	-	2,30	-	3,96
46	1,30	2,56	-	-	-	-	1,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,62
47	1,90	2,15	-	-	-	-	-	-	-	1,78	-	-	-	-	-	1,60	1,78	-	2,58
48	2,00	2,30	-	-	-	-	-	2,30	-	2,78	2,30	-	-	-	-	2,00	-	-	3,15
49	2,00	2,23	-	-	-	1,30	1,70	1,30	-	1,70	-	-	-	-	-	-	-	-	2,61
50	1,78	2,48	1,48	1,30	-	1,70	1,00	1,60	-	1,60	-	-	-	1,78	-	-	-	-	2,79

a presença de alguns dos géneros de fungos isolados no presente trabalho. Martins-Barreto e Sousa Dias (1979) referem que a frequência e a representatividade dos fungos isolados em 660 amostras de rações para suínos, aves, coelhos e bovinos foram *Penicillium* e *Fusarium*, com frequência superior a 70%. Martins e Martins (2001) referem a prevalência de bolores em Portugal em dietas para espécies pecuárias entre 1996 e 1998. Nesse estudo, indica-se que nas rações para suínos, 18,9% de 106 amostras estavam contaminadas com bolores, sendo os teores médios de  $7,8 \times 10^4$ /g e os géneros predominantes *Aspergillus* spp. (70%), *Mucor* spp. (58%), *Penicillium* spp. (54%) e *Fusarium* spp. (24%). Nas rações para bovinos a contaminação fúngica foi de 82,2% em 155 amostras, com teores médios de  $6,6 \times 10^4$ /g e os géneros assinalados foram, *Aspergillus* spp. (75%), *Penicillium* spp. (48%), *Mucor* spp. (43%) e *Fusarium* spp. (20%). Nas rações para aves, 93/117 amostras apresentaram contaminações por bolores, com teores médios de  $4,3 \times 10^4$ /g sendo os géneros mais frequentes *Aspergillus* spp. (62%), *Penicillium* spp. (76%) e *Mucor* spp. (53%). Verifica-se assim que os níveis de contaminação fúngica nesses rastreios foram semelhantes aos do presente estudo, embora referentes a amostras de alimentos compostos vocacionados para espécies diferentes.

A contagem de microrganismos mesófilos totais revelou teores médios de  $3,60 \log_{10}$  ufc/g em 33 amostras (66,0%) (Quadro II). Foram encontrados esporos de *Clostridium* sulfito redutores em 5 amostras (10%), com teores médios situados entre 1 e  $2 \log_{10}$  ufc/g. A presença de coliformes foi verificada em 26 amostras (52%) (Quadro II).

Os registos referentes à caracterização bacteriológica de alimentos compostos para animais são escassos. Embora referente a alimentos compostos para peixe, Cakmak e Kazim (2002), obtiveram contagens de microrganismos totais a 30 °C em 24 amostras que oscilaram entre 4,10 e  $4,26 \log_{10}$  ufc/g, valores superiores aos encontrados no presente estudo. Por outro lado, tem-se confirmado que a presença de *E. coli* e seus indicadores em pastagens e alimentos compostos para animais está associada a fontes fecais e de fertilização com estrumes (Lynn *et al.*, 1998). O isolamento de coliformes em 52% das amostras analisadas pode, assim, indicar o contacto dos alimentos com materiais de natureza fecal e a eventual presença de *E. coli*.

A pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria* spp. foi negativa nas 50 amostras. Esta situação pode decorrer de dois factores principais: primeiro o tratamento térmico utilizado na granulação é eficaz na inactivação de *Salmonella* e de *Listeria*;

QUADRO II – CARACTERIZAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE ALIMENTOS PARA CAVALOS (n=50).

Amostra	Log <sub>10</sub> ufc/g		
	Microrganismos mesófilos totais	Clostrídios sulfito-redutores	Coliformes
1	4,60	-	+
2	4,00	-	+
3	6,15	-	+
4	6,00	-	+
5	2,48	-	+
6	3,70	2,00	+
7	-	-	+
8	-	-	+
9	3,23	2,00	+
10	-	-	-
11	-	-	+
12	-	-	-
13	-	-	-
14	2,30	-	+
15	2,30	2,00	+
16	-	-	+
17	-	-	-
18	4,15	1,00	+
19	2,30	-	-
20	2,70	-	-
21	4,23	-	-
22	4,60	-	+
23	6,00	-	+
24	3,00	-	-
25	2,30	-	-
26	2,70	-	-
27	-	-	-
28	2,00	-	-
29	-	-	-
30	-	-	-
31	3,85	-	-
32	4,00	-	+
33	4,60	2,00	+
34	-	-	-
35	5,70	-	+
36	-	-	-
37	3,00	-	-
38	-	-	-
39	4,30	-	+
40	5,00	-	+
41	2,90	-	+
42	4,60	1,00	+
43	-	-	-
44	-	-	+
45	4,00	-	+
46	4,00	-	+
47	2,30	-	-
48	2,00	-	-
49	-	-	-
50	-	-	-

segundo como as rações têm cereais como ingrediente principal e não sendo proteaginosas e oleaginosas este tipo de contaminação é mais reduzido. De salientar que a listeriose animal é predominantemente uma doença de origem alimentar, sendo os alimentos contaminados sobretudo por via ambiental. No entanto, as silagens são os alimentos mais frequentemente associados a surtos e a casos esporádicos de listeriose em ruminantes (Roberts e Wiedmann, 2003) e em cavalos (Gudmundsdottir *et al.*, 2004) e animais para os quais existem mais registos de contaminações (Guerra *et al.*, 2005).

Nenhuma das 50 amostras analisadas, revelou níveis detectáveis de contaminação por aflatoxinas e por fumonisinas. Embora o exame micológico tenha revelado a presença de *Aspergillus flavus* em 35% das amostras positivas, não foram detectadas aflatoxinas. Por outro lado, não foram identificados bolores do género *Fusarium*, o que está de acordo com a ausência de fumonisinas. A OTA foi detectada em 30 amostras (60%) (Quadro III). Esta toxina é fundamentalmente sintetizada por *Aspergillus ochraceus*, mas também existem várias espécies de *Penicillium* spp. que a produzem (e.g., *P. variable*, *P. verrucosum*). Verificou-se, portanto, uma relação entre os valores de ocratoxina A detectados e a natureza dos bolores identificados, na medida em que o género *Penicillium* foi detectado em 80% das amostras com contaminações fúngicas.

Por outro lado, a pesquisa de DON foi positiva em 30% das amostras com teores compreendidos entre 100 e 316 µg/kg. Contudo não foi possível estabelecer uma relação bi-unívoca entre as contaminações fúngicas e as micotoxinas. A detecção da toxina DON não implica necessariamente uma contaminação por *Fusarium* spp.

Existem vários relatos da presença de micotoxinas em alimentos compostos para animais e matérias-primas em Portugal. Entre estes destacam-se os estudos de Martins *et al.* (1996) que conduziram à detecção de DON e Fumonisina em

QUADRO III – OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS, FUMONISINAS E OCRATOXINA A (N=50).

Micotoxinas	Total de amostras (N)	Positivas (N <sup>+</sup> ) (%)
Aflatoxinas	50	0 (0.0)
Fumonisin (B1 e B2)	50	0 (0.0)
Ocratoxina A	50	30(60,0)
Deoxinivalenol	50	15 (30.0)

milho cujos teores variaram entre 100 a 500 µg/kg e 10 a 1098 µg/kg, respectivamente. Anteriormente em 1987, Martins refere a incidência de DON e de contaminação por *Fusarium* spp. nas matérias-primas e de alimentos compostos para animais num estudo em que não foi possível estabelecer a relação entre o fungo e a micotoxina. As 164 amostras de alimentos compostos analisadas naquele estudo apresentavam contaminação por *Fusarium* e 6,77% das amostras relevaram a presença de DON com valores compreendidos entre 332 e 1000 µg/kg. Nas matérias-primas, os teores de contaminação oscilaram entre 500 e 16.600 µg/kg. Tal como no presente estudo, Martins (1987) verificou não existir uma relação entre a presença de *Fusarium* spp. e a produção de DON.

Quanto à pesquisa de Aflatoxinas em alimentos compostos para animais, verifica-se um decréscimo tendencial quando se comparam os dados referentes ao período de 1996 a 1998 (Martins e Martins, 2001) com o compreendido entre 2000 a 2002 (Martins, 2003). Na primeira daquelas compilações, verificou-se que em alimentos compostos para suínos a aflatoxina foi detectada em 19 de 106 amostras (17,9%), com níveis que variaram de 1 a 1470 µg/kg; em rações para bovinos leiteiros a aflatoxina foi detectada em 66,3% das 65 amostras analisadas com níveis de 1 a 48 µg/kg; em alimentos compostos para aves, esta toxina foi detectada em 19,6% de 23 amostras, com teores compreendidos entre 1 a 6,8 µg/kg. Na segunda das referidas compilações verificou-se que em amostras para suínos (N=45), bovinos (N=39) e aves (N=41) a aflatoxina foi detectada respectivamente, em 4,4% das amostras com teores de 2,0 µg/kg; em 3,25% das amostras com teores que variaram entre 5 e 15 µg/kg (acima do limite estabelecido pela União

QUADRO IV – INCIDÊNCIA E NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO DE Ocratoxina A (N<sup>+</sup>=30) E Deoxinivalenol (N<sup>+</sup>=15) (µg/kg).

Ocratoxina (OTA) (N <sup>+</sup> =30)				Deoxinivalenol (DON) (N <sup>+</sup> =15)			
2-3 µg/Kg	%	>3µg/Kg<5	%	100-120µg/Kg	%	120-320µg/Kg	%
25	83,4	5	16,6	14	93,3	1*	6,7

N<sup>+</sup> : número de amostras positivas; Limite de detecção de OTA: 2µg/Kg; Limite de detecção de DON: 100µg/Kg; \* amostra com um teor de 316 µg/Kg.

Europeia) e, finalmente, em 4,8% das amostras com níveis compreendidos entre 2,1 e 7,8µg/kg.

Para alimentos compostos para animais e respectivas matérias-primas existem em Portugal limites máximos estabelecidos para aflatoxinas e ocratoxina (Dec. Lei nº 100/2004, DR nº 104, I série de 4 de Maio e Regulamento 472/2002 EC de 12 de Março, respectivamente). Para a aflatoxina B<sub>1</sub>, o limite máximo estabelecido para as matérias-primas para alimentação animal é de 0,020 µg/kg; para alimentos completos é de 10 µg/kg para um teor de humidade de 12%. Relativamente à ocratoxina, o limite máximo admitido é de 5 µg/kg para cereais em grão e 3 µg/kg para derivados de cereais / consumo directo. Quanto aos teores máximos admitidos de DON e Fumonisin as os valores situam-se em 1000 e 1000-3000 µg/Kg, respectivamente (FAO, 2004).

## CONCLUSÕES

No presente estudo não foi possível estabelecer uma relação bi-unívoca entre as contaminações fúngicas e a ocorrência de micotoxinas. No entanto, a ocratoxina A pode estar associada à presença de *Penicillium* spp. nas rações. Os valores encontrados estão situados dentro dos limites máximos em alimentos para animais. Do ponto de vista de protecção da saúde dos cavalos, os dados deste trabalho revelam que aparentemente, em Portugal, as rações destinadas a esta espécie, não contém perigos de natureza microbiológica e toxicológica muito relevantes.

## BIBLIOGRAFIA

- BETINA, V., 1989. Aflatoxins, sterigmatocytins and versicolorins. In: *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier, New York, USA, pp. 114-150.
- CAHILL, L.M., KRUGER, S C., MCALICE, B.T., RAMSEY, C.S., PRIOLI, R. e KOHN, B., 1999. Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *J. Chromatog.*, 859:23-28.
- CAKMAK, M.N. e KAZIM, A., 2002. Mycological and bacteriological survey on fish feed ingredients and mixed feeds in Elazığ Province. *Online J. Biol. Sci.*, 2: 757-758.
- DOMSCH, K.H., GAMS, W. e ANDERSON, T-H., 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, New York, pp. 1-1156.
- EN ISO 4833 (International Standards Organization), 2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for enumeration of microorganisms. Colony counts technique at 30 °C*. International Standards Organization, Geneva, Switzerland.



- EN ISO 6579 (International Standards Organization), 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Standards Organization, Geneva, Switzerland.
- ENTWISTLE, A.C., WILLIAMS, A. C., MANN, P. J. e SLACK, P.T. 2000., Liquid chromatographic Method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in Barley: collaborative study. J. AOAC Int., 83:1377-1383.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2004. Food and Nutriton Paper nº 81. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Rome. Italy, pp. 165-169.
- GUERRA, M. M. e BERNARDO, F. M. A., 2000. Ocorrência de *Listeria spp.* em leite e laticínios tradicionais portugueses. Rev. Port. Zootec., VII (2): 37-47.
- GUERRA, M. M., OLIVEIRA, M., FERNANDES, A. e BERNARDO, F. M., 2005. Qualidade microbiológica de silagens – contaminação por *Listeria monocytogenes*. Rev. Port. Zoot. (In press).
- GUÐMUNDSDÓTTIR, K.B., SVANSSON, V., AALBAEK, B., GUNNARSSON, E. e SIGURDARSON, S., 2004. *Listeria monocytogenes* in horses in Iceland. Vet. Rec., 155: 456-459.
- KROGH, P., 1987. Mycotoxins in food. P. Krogh. (Ed). London Academic Press, UK, pp. 1-122.
- KURTZMAN, C.B., HORN, B.W. e HESSELTINE, C.W., 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. Antonie van Leeuwenhoek, 53:147-158.
- LACEY, J., 1986. Factors affecting mycotoxin production. In: Mycotoxins and Phycotoxins, P.S. Steyn e R.Vleggaar (Eds), Elsevier, pp. 65-76.
- LYNN, T.V., HANCOCK, D.D., BESSER, T.E., HARRISON, J.H., RICE, D.H., STEWART, N.T. e ROWAN, L.L., 1998. The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. J. Dairy Sci., 81:1102-1108.
- MARTINS, M. L., 1987. Estudo preliminar da incidência de deoxinivalenol (vomitoxina) nas matérias primas e alimentos compostos para animais. Rep. Trab. LNIV, vol XIX., pp. 79-86.
- MARTINS, H.M., 2003. Occurrence of aflatoxins in raw material and in feedsutfts in Portugal (2000-2003). Livro de resumos do Congresso "Food Protection International Conference". Monte de Caparica, Portugal, p. 77.
- MARTINS, M.L. e MARTINS, H.M., 2000. Natural occurrence of alatoxins in cattle feed in Portugal (1996/19999). In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, Logrieco, A. (Eds). COST Action 835, CNR, Bari, Italy, pp. 131-146.
- MARTINS, H.M. e MARTINS, M.L., 2001. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal): 1996-1999. Rev. Port. Ciên. Vet., 96: 85-88.
- MARTINS, M.L., MARTINS, H.M. e GIMENO, A., 1996. Ocorrência natural de fumonisinas e de deoxinivalenol em milho comercializados em Portugal. Rev. Port. Cien. Vet., 518: 88-90.

- MARTINS-BARRETO, M.L. e SOUSA DIAS, M.C., 1979. Contribuição para o estudo da frequência e toxicidade de alguns fungos considerados potencialmente patogênicos em alimentos para animais. Rep.Trab. LNIV, vol XI, pp. 27-36.
- MILLER, J.D. e TRENHOLM, H.L., 1994. Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxin. Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA, p. 552.
- NEWMAN, K.E. e RAYMOND, S.L., 2005. Effects of mycotoxins in horses. In: The mycotoxin blue book, Diaz, D. (Ed). Nottingham University Press, U.K., pp. 57-76.
- NP (Norma Portuguesa) 2164, 1983. Microbiologia Alimentar. Regras Gerais para a pesquisa de bactérias coliformes.
- NP (Norma Portuguesa) 2262, 1986. Microbiologia Alimentar. Regras Gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores.
- NP (Norma Portuguesa) 3277-2, 2002. Microbiologia Alimentar. Regras Gerais para a contagem de bolores e leveduras a 25 °C. Parte 2: Método de referência.
- ROBERTS, A.J. e WIEDMANN, M., 2003. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. CMLS Cell. Mol. Life Sci., 60: 904-918.
- SHEPHARD, S., SYDENHAM, W., THIEL, G. e GELDERBLOM, A., 1990. Quantitative determination of Fumonisin B1 and B2 by HPLC with fluorescence detection. J. Liquid Chromat., 13: 2077-2087.
- SMITH, J.E. e MOSS, M.O., 1985. Mycotoxins. Formation, analysis and significance. Ed. John, Wiley e Sons Lda. Chichester, U.K., 148 p.
- UENO, Y., 1987. Trichothecenes in food. In: Mycotoxins in Food. Food Science and Technology. A series of monographs. P. Krogh (Ed)., Academic Press, UK., pp. 123-148.
- WILKENS, C.A., 1994. Equine Salmonellosis. In: Infection diseases of livestock with special reference to Southern Africa., J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson, e R.C. Tustin (Eds). Oxford University Press, Southern Africa, pp. 1125-1129.

## EFFECT OF CASTRATION AND AGE ON BEEF CHARACTERISTICS OF ANIMALS PRODUCED ON PASTURE

C.G. MONTEIRO\*\*, D. NAVAS\* e J.P.C. LEMOS\*\*

\* Estação Zootécnica Nacional, Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal

\*\* CIISA – Faculdade de Medicina Veterinária, Pólo Universitário do Alto da Ajuda, Rua Prof. Cid dos Santos, 1300-477 Lisboa, Portugal. e-mail: jpclemos@fmv.utl.pt

(Recepção: 7 de Junho de 2005; Aprovado: 6 de Outubro de 2005)

### ABSTRACT

The purposes of this trial were to evaluate the influence of castration and age in meat characteristics of Alentejana breed produced on pasture and slaughtered at similar carcass fat. 25 males of Alentejana breed, 13 of which castrated 7 with 6 month of age and 6 with 12 month. All the animals grazed a rye-grass pasture for one year and were supplemented with poor quality hay during periods of low availability and/or low quality of grass. After the grazing period, steers and bulls were finished in a *feed-lot* during 90 and 120 days, respectively, in order to reduce carcass fat differences. After 7 days of ageing, meat samples of *Longissimus lumborum* muscle were collected in order to evaluate water holding capacity, colour ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ), pH, total pigments, intramuscular fat, total collagen and its solubility, myofibril fragmentation index, cooking losses and shear force. The chemical and physics characteristics of the meat in the Alentejana breed, were not influenced by castration, except the pH and  $b^*$  value, which were lower and higher, respectively, in bulls. The influence of age was only visible in the parameters of the colour ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ), where  $L^*$  was lower and  $a^*$  and  $b^*$  higher in 12 month animals. Regarding these results we concluded that castration and age had a slight influence in meat quality.

**Key-words:** age, castration, cattle, grazing, meat quality

## EFEITO DA CASTRAÇÃO E DA IDADE NAS CARACTERÍSTICAS DA CARNE DE BOVINOS PRODUZIDOS EM SISTEMA DE PASTOREIO

### RESUMO

O objectivo do presente trabalho consistiu no estudo do efeito da castração e da idade nas características da carne de bovinos de raça Alentejana produzidos em sistemas de pastoreio, abatidos a igual quantidade de gordura da carcaça. Para tal,

utilizaram-se 25 animais de raça Alentejana, 13 dos quais foram castrados, 7 aos 6 meses de idade e 6 aos 12 meses. Após a castração, todos os animais foram colocados numa pastagem à base de azevém durante cerca de um ano, tendo sido suplementados ao nível da manutenção com fenos de baixa qualidade durante os períodos de escassez e/ou baixa qualidade da erva. Após o período de pastoreio, realizou-se um período de acabamento em *feed-lot* com a duração de 90 e 120 dias para os animais castrados e inteiros, respectivamente, com o objectivo de anular as diferenças de quantidade de gordura na carcaça. Após sete dias de maturação, colheram-se amostras do músculo *Longissimus lumborum*, onde foram avaliados os seguintes parâmetros: capacidade de retenção da água, cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), pH, teores em pigmentos totais, de gordura intramuscular, de colagénio total e sua solubilidade, índice de fragmentação miofibrilar, perdas por cozedura e força de corte. As características físico-químicas da carne não foram afectadas pela castração, à excepção do pH e do valor de  $b^*$ , que foram mais baixo e mais elevado, respectivamente, nos animais inteiros. O efeito da idade fez-se sentir nos parâmetros da cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), sendo o valor  $L^*$  inferior e os valores de  $a^*$  e de  $b^*$  superiores nos animais mais velhos. De acordo com estes resultados, podemos concluir que tanto a castração como a idade tiveram um efeito reduzido nas características da carne.

Palavras-Chave: bovinos, castração, idade, pastoreio, qualidade da carne

## INTRODUÇÃO

Contrariamente ao que se verifica na generalidade dos outros países, a produção de carne de bovino em sistemas de pastoreio no nosso País tem utilizado sempre machos inteiros. É consensual que, em sistemas intensivos, os machos inteiros apresentam uma velocidade de crescimento mais elevada, melhor índice de conversão, carcaças mais magras e com melhor conformação, enquanto os castrados originam uma carne de melhor qualidade (Seideman *et al.*, 1982). Os problemas potenciais apontados relativamente à carne dos animais inteiros são a ocorrência de carne DFD, consequência de *stress* antes do abate (Field, 1971; Reagan *et al.*, 1971; Tarrant e Sherington, 1980), e de carne com valores de tenrura mais baixos e mais variáveis do que a dos machos castrados (Field, 1971; Seideman *et al.*, 1982; Cross, *et al.*, 1984; Crouse *et al.*, 1985b; Wood, 1990). Estas diferenças na tenrura têm sido atribuídas a diferenças na quantidade de gordura da carcaça (Field, 1971; Boccard *et al.*, 1979; Riley *et al.*, 1983; Cross *et al.*, 1984; Dikeman *et al.*, 1986) e de gordura intramuscular (Field, 1971; Dransfield *et al.*, 1984; Dikeman *et al.*, 1986), assim como a diferenças quantitativas e qualitativas no tecido conjuntivo (Boccard *et al.*, 1979; Seideman *et al.*, 1982; Crouse *et al.*, 1983;

Dransfield *et al.*, 1984). Assim, definiram-se como objectivos deste trabalho o estudo do efeito da castração e da idade nas características da carne de bovinos produzidos em sistemas de pastoreio, abatidos a igual quantidade de gordura da carcaça.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 25 machos de raça Alentejana, 13 com 6 a 7 meses e 12 com cerca de um ano de idade. O ensaio teve início no final da Primavera, momento em que se castraram 7 animais do grupo mais jovem e 6 do grupo mais velho. Após a castração, os animais permaneceram cerca de um ano em sistema de pastoreio rotacional numa pastagem à base de azevém, com um encabeçamento de cerca de 1 animal/ha, sendo suplementados com feno durante as épocas de escassez de alimento. No final do período de pastoreio colocaram-se os animais no *feed-lot* da Estação Zootécnica Nacional (EZN), onde se procedeu ao acabamento com uma dieta adequada. Com o objectivo de minimizar as diferenças de gordura na carcaça entre os dois sexos, o período de acabamento teve a duração de 90 e de 120 dias para os castrados e inteiros, respectivamente.

O abate dos animais efectuou-se no matadouro experimental da Unidade de Carcaças da EZN. Depois da sua preparação, colocaram-se as carcaças numa câmara de refrigeração a 9 °C durante cerca de 5 horas, após o que se transferiram para a câmara de maturação a 0 °C. Ao fim de 7 dias de maturação, colheram-se amostras do músculo *Longissimus lumborum*. Colheu-se uma amostra da região caudal com cerca de 500 g, destinada à medição do pH, da cor e da capacidade de retenção da água e, posteriormente, à preparação de amostras frescas e para congelar destinadas à análise laboratorial. Destas, as amostras para congelar embalaram-se a vácuo e armazenaram-se a -20 °C, sendo posteriormente liofilizadas. Para a avaliação das perdas por cozedura e da força de corte colheu-se um bife com cerca de 2,5cm de espessura, que foi embalado a vácuo e congelado a -20 °C.

A medição do pH efectuou-se com um potenciómetro portátil com eléctrodo de penetração (Hanna Instruments, modelo HI8424), em três localizações diferentes da amostra. A medição da cor efectuou-se com um colorímetro (Minolta Chroma, modelo CR300) utilizando o sistema CIE  $L^* a^* b^*$ , após uma hora de exposição ao ar e em duas localizações. O  $L^*$  é designado por Luminosidade (value), e o  $a^*$  e o  $b^*$  são designados por coordenadas de cromaticidade e indicam o índice de

vermelhos e amarelos, respectivamente. Para avaliar a capacidade de retenção de água utilizou-se o método por pressão com papel de filtro descrito por Santos-Silva *et al.* (2002). A determinação da concentração dos pigmentos totais efectuou-se através do doseamento de cianometamioglobina e cianometahemoglobina (Wierbicki *et al.*, 1955). A determinação do Índice de Fragmentação Miofibrilhar efectuou-se pelo método proposto por Olson e Parrish (1977) e alterado por Culler *et al.* (1978). A determinação do teor em colagénio total e da sua solubilidade foi feita por doseamento da hidroxiprolina. A preparação das amostras efectuou-se com base no método descrito por Hill (1966) e o doseamento da hidroxiprolina efectuou-se com base na técnica descrita na NP-1987 (1982) modificado por Silva (1996). O teor de gordura intramuscular determinou-se com base no método descrito na NP-1224 (1982). As perdas por cozedura determinaram-se pela diferença de peso antes e depois da carne ser grelhada até atingir a temperatura de 70 °C no seu centro geométrico. A temperatura mediu-se com o auxílio de uma sonda com termómetro (Delta OHM, modelo HD8704). A determinação da força de corte efectuou-se num texturómetro (TA-tx2i Texture Analyser, Stable Micro Systems) equipado com uma lâmina do tipo Warner-Bratzler, ligado a um computador com software específico (Texture Expert Exceed, Stable Micro Systems). Para a determinação da força de corte utilizaram-se os bifes que serviram para o cálculo das perdas de água por cozedura, tendo-se preparado 8 a 10 sub-amostras paralelepipedicas, com 1 cm<sup>2</sup> de secção, longitudinalmente ao sentido das fibras musculares.

O tratamento estatístico dos dados foi feito por análise de variância pelo programa SAS, através do procedimento GLM (General Linear Models Procedure).

O modelo utilizado foi um modelo de efeitos fixos a dois factores com interacção:

$$Y_{ijk} = m + r_i + s_j + (rs)_{ij} + e_{ijk}$$

em que:

$Y_{ijk}$  = valor observado para a variável dependente em estudo no indivíduo  $i$  e no tratamento  $j$

$m$  = média global

$r_i$  = efeito do sexo  $i$

$s_j$  = efeito da idade à castração  $j$

$(rs)_{ij}$  = efeito da interacção do sexo  $i$  com a idade à castração  $j$

$e_{ijk}$  = erro

O efeito da interação foi retirado do modelo, dado que não foi significativo para as variáveis em estudo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro I apresentam-se as médias e respectivos erros padrão da média e nível de significância do efeito da castração e da idade, relativamente à capacidade de retenção da água, parâmetros da cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), pH, pigmentos totais, gordura intramuscular, colagénio total, solubilidade do colagénio, índice de fragmentação miofibrilar, perdas por cozedura e força de corte da carne dos animais de raça Alentejana.

Os resultados obtidos indicam que o efeito da castração não foi significativo para a maioria das variáveis, à excepção dos valores de  $b^*$  e de pH, que foram mais elevados e mais baixos, respectivamente, nos animais inteiros. Quanto à idade, apenas se encontraram efeitos significativos nos parâmetros da cor, verificando-se que os animais mais velhos apresentam valores mais baixos de  $L^*$  e mais elevados de  $a^*$  e de  $b^*$ .

QUADRO I – EFEITOS DA CASTRAÇÃO E DA IDADE NA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DA ÁGUA (CRA), NOS VALORES  $L^*$ ,  $a^*$  E  $b^*$ , NO PH, NOS PIGMENTOS TOTAIS (PIG), NA GORDURA INTRAMUSCULAR (GI), NO COLAGÉNIO TOTAL (CT), NA SOLUBILIDADE DO COLAGÉNIO (SC), NO ÍNDICE DE FRAGMENTAÇÃO MIOFIBRILHAR (IFM), NAS PERDAS POR COZEDURA (PCOZ) E NA FORÇA DE CORTE (FC) DA CARNE.

VARIÁVEIS	SEXO				IDADE				Nível de Significância	
	Castrados (n=13)		Inteiros (n=12)		6 meses (n=13)		12 meses (n=12)		Sexo	Idade
	$\bar{X}$	epm	$\bar{X}$	epm	$\bar{X}$	epm	$\bar{X}$	epm		
CRA (%)	36,27	1,657	37,51	1,734	38,51	1,802	35,27	1,595	NS	NS
$L^*$	36,23	0,617	36,98	0,646	37,77	0,671	35,44	0,594	NS	*
$a^*$	19,19	0,349	19,79	0,366	18,65	0,380	20,33	0,336	NS	**
$b^*$	7,12	0,223	7,92	0,233	7,17	0,242	7,87	0,214	*	*
PH	5,57	0,021	5,45	0,022	5,49	0,023	5,53	0,020	***	NS
PIG (%)	1,03	0,045	1,07	0,047	1,00	0,049	1,10	0,043	NS	NS
GI (%MS)	3,19	0,237	3,15	0,248	3,26	0,258	3,07	0,228	NS	NS
CT (%MS)	3,62	0,131	4,05	0,137	3,81	0,142	3,86	0,126	NS	NS
SC (%)	15,05	0,990	17,60	1,036	17,11	1,077	15,53	0,952	NS	NS
IFM	29,96	1,661	24,96	1,737	27,72	1,806	27,20	1,598	NS	NS
PCOZ (%)	29,92	1,483	28,43	1,821	29,98	1,821	28,37	1,483	NS	NS
FC (kg)	4,55	0,320	4,03	0,334	4,24	0,348	4,35	0,308	NS	NS

NS – não significativo; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Os resultados obtidos indicam que o efeito da castração nos parâmetros normalmente relacionados com a cor da carne é diminuto, dado que, com excepção do valor de  $b^*$ , não se encontraram diferenças significativas para os parâmetros com influência naquela característica. Estes resultados parecem estar de acordo com os obtidos por Shackelford *et al.* (1992), que demonstraram que, quando comparados à mesma idade, os machos inteiros apresentavam valores de  $L^*$  e de  $b^*$  mais baixos que os castrados e que o de  $a^*$  não era afectado pela castração. Com efeito, apesar da diferença não ser significativa, os resultados do presente estudo indicam que os castrados tendem a apresentar um valor de  $L^*$  mais baixo. Outros autores não encontraram diferenças na cor da carne entre machos inteiros e castrados (Field, 1971; Monin, 1991; Micol *et al.*, 1993).

O efeito da castração não foi significativo no teor de pigmentos musculares, o que está de acordo com Field (1971). Pelo contrário, Arthaud *et al.* (1977) verificaram que, quando comparados à mesma idade, os animais inteiros apresentavam valores mais elevados do que os castrados.

O pH final foi afectado pela castração, sendo mais elevado nos animais castrados, o que contraria os resultados referidos na bibliografia. Com efeito, vários autores verificaram que o pH final é mais elevado em machos inteiros do que em castrados (Purchas, 1990; Jeremiah *et al.*, 1991; Shackelford *et al.*, 1992; Purchas e Aungsupakorn, 1993), devido à maior susceptibilidade dos primeiros ao *stress* durante o transporte, o que não era de esperar que ocorresse no caso presente, dado que os animais estavam alojados em local próximo ao matadouro.

Quanto ao efeito da idade, observou-se que os animais mais velhos apresentaram valores mais baixos de  $L^*$  e mais elevados de  $a^*$  e de  $b^*$ , o que é indicativo de cor mais escura. Estes resultados seriam de esperar já que diversos autores defendem que com o aumento da idade dos animais a cor da carne torna-se mais escura e mais avermelhada. Warner (1989) afirma que a luminosidade ( $L^*$ ) da superfície da carne diminui com a idade do animal e o avermelhado ( $a^*$ ) aumenta ligeiramente. Se considerarmos que o aumento do tempo de acabamento se pode confundir com o aumento da idade, estes resultados parecem estar de acordo com Keane e Allen (1998). Estes autores verificaram que os valores de  $a^*$  e de  $b^*$  aumentam ao longo do período de acabamento.

A idade não teve um efeito significativo no teor de pigmentos, o que contraria a generalidade da bibliografia, a qual refere que aumenta com a idade e com o peso da carcaça (McDougall, 1982; Warner, 1989; Micol *et al.*, 1993). Vários autores referem que a evolução do teor de pigmentos com a idade não é linear (Lemos,



1997), verificando-se que o aumento é rápido até cerca dos 16 a 18 meses, abrandando posteriormente (Monin, 1991; Micol *et al.*, 1993). No entanto, Renerre (1982) refere que a idade a que o aumento do teor de pigmentos é máximo varia com a raça, o que poderá explicar, em parte, a divergência entre os resultados e a bibliografia.

Não foram encontradas diferenças de valor do pH entre os animais dos dois escalões etários. Wismer-Pedersen (1994) afirma que o pH aumenta com a idade, embora se refira a diferenças entre novilhos e animais adultos.

É de referir que os valores do pH final são próximos do valor considerado normal de 5,5. Com efeito, Page *et al.* (2001) referem que 81,3% dos animais se encontram dentro de um intervalo de valores de pH final entre 5,40 e 5,59.

De acordo com a bibliografia, a cor da carne é afectada pelo teor de pigmentos (MacDougall, 1982; Renerre, 1982; Girard, 1984; Warner, 1989) e pH final (Renerre, 1982; Warner, 1989; Purchas, 1990; Monin, 1991; Page *et al.*, 2001). Esta relação parece não existir nos nossos resultados, dado que a castração e a idade não influenciaram o teor de pigmentos, contudo verificaram-se diferenças significativas nos valores de  $L^*$ , de  $a^*$  e de  $b^*$ . Page *et al.* (2001) referem que os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  estão negativamente correlacionados com o pH, ou seja, à medida que o pH aumenta os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  diminuem. No presente estudo, apesar do efeito da castração não ser significativo, a variação destes parâmetros está de acordo com o exposto na bibliografia. No entanto, nos resultados referentes ao efeito da idade esta relação não se verifica.

A capacidade de retenção de água não foi afectada pelos efeitos em estudo. Na bibliografia a informação sobre este assunto é controversa. Com efeito, encontram-se referências ao aumento da água retida com a idade dos animais (Hamm, 1963; Boccard, 1970), sendo a influência do peso corporal superior à da idade (Hamm, 1963). Todavia Lemos (1997) não encontrou variação com o aumento de peso vivo, enquanto Silva (1996) concluiu que diminuía. Dransfield *et al.* (1984) verificaram que a capacidade de retenção de água não é afectada pela castração do animal, enquanto Arthaud *et al.* (1977) concluem que a água retida é superior nos inteiros. No entanto, esta característica está fortemente associada ao pH final da carne, aumentando a água retida no músculo com o aumento do pH final (Purchas, 1990; Monin, 1991; Touraille, 1991), parecendo ser o principal factor de variação. Deste modo, os resultados seriam esperados, dado que o pH também não sofreu grandes variações. A este respeito é de referir que, apesar da diferença entre castrados e inteiros no pH ser significativa, a amplitude da variação é reduzida.

A quantidade de gordura intramuscular também não foi significativamente diferente quer entre castrados e inteiros quer entre idades. A bibliografia refere que os animais castrados possuem maior quantidade de gordura intramuscular do que os inteiros (Field, 1971; Arthaud *et al.*, 1977; Seideman *et al.*, 1982; Dransfield *et al.*, 1984; Dikeman *et al.*, 1986), dado que são também mais gordos ao abate. Assim, tendo em conta que os animais possuíam semelhante quantidade da gordura total da carcaça (dados não apresentados), pode-se concluir que não existe um efeito da castração na quantidade de gordura intramuscular. Apesar de alguns autores referirem que o teor em gordura intramuscular aumenta com a idade do animal, neste trabalho tal não se verificou, provavelmente pelo facto do teor em gordura intramuscular estar mais relacionado com o nível e tipo de alimentação do que com a idade.

Embora a maioria dos autores refira que os animais inteiros possuem teor mais elevado de colagénio (Cross *et al.*, 1984; Crouse *et al.*, 1985b; Gerrard *et al.*, 1987; Bailey e Light, 1989) e colagénio com menor solubilidade (Gerrard *et al.*, 1987; Bailey e Light, 1989), os resultados obtidos neste trabalho não indicam a existência de diferenças significativas entre castrados e inteiros. No entanto, estes resultados não são consensuais. No que respeita à quantidade de colagénio, outros autores também não encontraram diferenças significativas entre castrados e inteiros (Prost *et al.*, 1975; Dikeman *et al.*, 1986). Crouse *et al.* (1985a) e Burson *et al.* (1986) referem que quando as comparações se efectuam após ajustamento para igual quantidade de gordura da carcaça e a igual idade, respectivamente, não se encontram diferenças significativas. Estes resultados podem explicar os obtidos no presente trabalho dado que, não se verificaram diferenças entre castrados e inteiros na gordura da carcaça e os animais tinham idade semelhante. Quanto à solubilidade, quando as comparações se efectuam à mesma idade os machos inteiros apresentam valores mais elevados (Boccard, 1978), idênticas (Cross *et al.*, 1984; Dikeman *et al.*, 1986) ou mais baixos (Crouse *et al.*, 1985b; Burson *et al.*, 1986), não sendo os resultados obtidos consensuais.

A idade também não afectou significativamente o teor de colagénio e a sua solubilidade. Alguns autores referem que a quantidade de colagénio se mantém relativamente constante com a idade e o peso de abate (Dikeman *et al.*, 1986; McKormick, 1994), o que está de acordo com os nossos resultados. Em contraste outros estudos revelam que diminui (McKeith *et al.*, 1985; Silva, 1996). No entanto, Lemos (1997) verificou existir um efeito da raça na evolução do teor de colagénio com o peso de abate, tendo observado que diminuiu na Alentejana e na Mertolenga,

enquanto na Barrosã e Frísia não varia. Quanto à solubilidade do colagénio, parece ser consensual que diminui com a idade (Hill, 1966; Cross *et al.*, 1984; Dikeman *et al.*, 1986; Gerard *et al.*, 1987; Silva, 1996; Lemos, 1997), o que está em desacordo com os resultados do presente estudo. No entanto, certos autores referem que a solubilidade do colagénio aumenta com o nível alimentar (Crouse *et al.*, 1985a; Silva, 1996), verificando-se o mesmo com a realização dum período de acabamento antes do abate (Aberle *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 1987) e sem aumentar a quantidade (Miller *et al.*, 1987), consequência da elevada síntese de novas e imaturas, moléculas de colagénio (Bailey, 1988). Kopp (1976) verificou que a solubilidade do colagénio de animais com 2 anos de idade sujeitos a crescimento compensatório era semelhante ao de animais mais jovens. Assim, os resultados obtidos por estes autores parecem justificar os do presente trabalho, dado que todos os animais foram submetidos a um período de acabamento após o pastoreio, ou seja, é possível que o efeito do acabamento na solubilidade do colagénio se tenha sobreposto ao efeito da idade.

O índice de fragmentação miofibrilhar não foi afectado nem pela castração nem pela idade. Na bibliografia não é conhecido o efeito da castração naquele parâmetro, tornando difícil a discussão dos resultados. No entanto, alguns autores sugerem a existência duma correlação positiva entre a temperatura muscular medida entre as 2 e as 6 h após o abate e a tenrura da carne, sendo este o factor isolado com maior influência nesta característica organoléptica (McKeith *et al.*, 1985; May *et al.*, 1992; Lemos, 1997). Este efeito benéfico do menor ritmo de arrefecimento na tenrura da carne pode ser explicado pelo efeito de aumento da actividade enzimática proteolítica (Seideman *et al.*, 1987; Smulders *et al.*, 1990; May *et al.*, 1992), nomeadamente das calpaínas (Aberle *et al.*, 1981; Lee e Ashmore, 1985), desde que o pH seja ainda elevado (Marsh *et al.*, 1981 cit. Lemos, 1997), dado que estas condições são óptimas para a sua actividade.

No presente trabalho não foram efectuadas medições da temperatura após o abate. O facto de não se terem verificado diferenças entre castrados e inteiros na quantidade de gordura da carcaça, nem de gordura intramuscular, poderá levar a concluir que não ocorreram diferenças no ritmo de arrefecimento muscular, justificando a não existência de diferenças significativas devido à castração no índice de fragmentação miofibrilhar. No entanto esta justificação dificilmente será aplicável no efeito da idade, já que os animais mais velhos eram mais pesados (dados não apresentados) e deveriam ter, consequentemente, um menor ritmo de arrefecimento devido à maior massa muscular.

As perdas por cozedura também não foram afectadas pelos efeitos em estudo. De igual modo, os resultados encontrados na bibliografia são controversos. Crouse *et al.* (1985b) e Purchas e Aungsupakorn (1993) não encontraram qualquer efeito da castração nesta característica da carne, enquanto Purchas (1990) afirma que os machos inteiros apresentam menores perdas por cozedura, Dransfield *et al.* (1984) e Dikeman *et al.* (1986) verificaram o contrário. De acordo com Clinquart *et al.* (1994) e Dufrasne *et al.* (1995), existe uma relação negativa entre a quantidade de gordura intramuscular e as perdas por cozedura, o que pode explicar, em parte, os resultados obtidos no presente trabalho já que não se encontraram diferenças significativas entre castrados e inteiros na quantidade de gordura intramuscular.

A força de corte da carne também não foi afectada por nenhum dos efeitos em estudo. Pelo contrário, diversos autores referem que a carne dos animais castrados é mais tenra do que a dos inteiros (Field, 1971; Reagan *et al.*, 1971; Crouse *et al.*, 1983; Dikeman *et al.*, 1986; Purchas, 1990; Jeremiah *et al.*, 1991; Purchas e Aungsupakorn, 1993). Os resultados sobre o efeito da castração na tenrura da carne, apesar de contrariarem os encontrados na bibliografia, não são totalmente inesperados. Com efeito, as variáveis estudadas que têm uma influência determinante na tenrura da carne (gordura intramuscular, colagénio total e sua solubilidade e índice de fragmentação miofibrilhar) também não foram significativamente afectados pela castração e as correlações entre elas e a força de corte também não foram significativas (dados não apresentados). Esta pode ser também a explicação para o facto de não se ter encontrado um efeito da idade naquela característica organoléptica. A afirmação generalista de que a tenrura diminui com idade baseia-se, essencialmente, na comparação entre animais de diferentes escalões etários.

De referir que, globalmente, a carne dos animais deste trabalho pode ser considerada tenra, dado que os valores observados da força de corte se encontram no intervalo de 4 a 5 kg referidos por alguns autores (Powell, 1991; Jones e Tatum, 1994).

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que nos animais produzidos em sistemas de pastoreio com um período curto de acabamento e composição da carcaça semelhante, a castração tem pouca influência nas características da carne. De igual modo pode-se concluir que o efeito da idade

afecta apenas a cor da carne, apresentando os animais mais velhos uma carne de cor mais escura.

#### **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi financiado pelo Projecto PIDDAC 819/99.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- ABERLE, E.D., REEVES, E.S., JUDGE, M.D., HUSLEY, R.E. e PERRY, T.W., 1981. Palatability and muscle characteristics of cattle with controlled weight gain: time on a high energy diet. *J. Anim. Sci.*, 52(4): 757-763.
- ARTHAUD, V.H., MANDIGO, R.W., KOCH, R.M. e KOTULA, A.W., 1977. Carcass composition, quality and palatability attributes of bulls and steers fed different energy levels and killed at four ages. *J. Anim. Sci.*, 44: 53-64.
- BAILEY, A. J., 1988. Connective tissue and meat quality. *Proceedings of the 34<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*, part, pp. 152-160.
- BAILEY, A.J. e LIGHT, N.D., 1989. *Connective tissue in meat and meat products*. Elsevier Applied Science, London.
- BOCCARD, R., 1970. Qualité de la viande de taurillon. Tendreté, couleur, rétention d'eau. In: *La Production de Viande par les Jeunes Bovins*. Institut National de La Recherche Agronomique, Versailles, France.
- BOCCARD, R., 1978. Development of connective tissue and its characteristics. In: H. de Boer and J. Martin (eds.), *Patterns of Growth and Development in Cattle*. Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 73-90.
- BOCCARD, R., NAUDE, R.T., CRONJE, D.E., SMIT, M.C., VENTER, H.J. e ROSSOUW, E J., 1979. The influence of age, sex and breed of cattle on their muscle characteristics. *Meat Sci.*, 3: 261-280.
- BURSON, D.E., HUNT, M. C., UNRUH, J. A. e DIKEMAN, M. E., 1986. Proportion of types I and III collagen in Longissimus collagen from bulls and steers. *J. Anim. Sci.*, 63: 453-456.
- CLINQUART, A., VAN EENAEME, C., VAN VOOREN, T., VAN HOOF, J. e ISTASSE, L., 1994. Carcass characteristics and meat quality of dual purpose type bulls as influenced by two growth patterns during the growing period. *Proceedings of the 40<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*.
- CROSS, H.R., SCHANBACHER, B.D. e CROUSE, J. D., 1984. Sex, age and breed related changes in bovine testosterone and INTRAMUSCULAR collagen. *Meat Sci.*, 10: 187-195.
- CROUSE, J. D., SEIDEMAN, S.C. e CROSS, H.R., 1983. The effect of carcass electrical stimulation and cooler temperature on the quality and palatability of bull and steers beef. *J. Anim. Sci.*, 56 (1): 81-90.

- CROUSE, J. D., CROSS, H. R. e SEIDEMAN, S. C., 1985a. Effect of sex condition, genotype and diet on bovine growth and carcass characteristics. *J. Anim. Sci.*, 60 (5): 1219-1227.
- CROUSE, J. D., CROSS, H. R. e SEIDEMAN, S. C., 1985b. Effects of sex condition, genotype, diet and carcass electrical stimulation on the collagen content and palatability of two bovine muscles. *J. Anim. Sci.*, 60 (5): 1228-1234.
- CULLER, R. D., PARRISH JR., F. C., SMITH, C. G. e CROSS, H. R., 1978. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. *J. Food Sci.*, 43: 1177-1180.
- DIKEMAN, M. E., REDDY, G. B., ARTHAUD, V. H., TUMA, H. J., KOCH, R. M., MANDIGO, R. W. e AXE, J. B., 1986. Longissimus muscle quality, palatability and connective tissue histological characteristics of bulls and steers fed different energy levels and slaughtered at four ages. *Anim. Sci.*, 63: 92-101.
- DRANSFIELD, E., NUTE, G. R. e FRANCOMBE, M. A., 1984. Comparison of eating quality of bulls and steers beef. *Anim. Prod.*, 39: 37-50.
- DUSFRASNE, I., GIELEN, M., LIMBOURG, P., VAN EENAEME, C. e ISTASSE, L., 1995. Effects of a grazing period on performance of finishing bulls: comparison with indoor finishing system. *J. Anim. Sci.*, 60: 75-80.
- FIELD, R.A., 1971. Effect of castration on meat quality and quantity. *J. Anim. Sci.*, 32 (5): 849-858.
- GERRARD, D. E., JONES, S. J., ABERLE, E. D., LEMENAGER, R. P., DIEKMAN, M. A. e JUDGE, M. D., 1987. Collagen stability, testosterone secretion and meat tenderness in growing bulls and steers. *J. Anim. Sci.*, 65: 1236-1242.
- GIRARD, J. P., 1984. Les composantes de la qualité de la viande du tissu adipeux et des produits carnés. *Bull. Techn. C.R.Z.V. Theix I.N.R.A.*, 56: 59-67.
- HAMM, R., 1963. The water-holding capacity of meat. *Symposium Carcase Composition and Appraisal of Meat Animals, Australia.*
- HILL, F., 1966. The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages. *J. Food Sci.*, 31: 161-166.
- JEREMIAH, L. E., TONG, A. K. W. e GIBSON, L. L., 1991. The usefulness of muscle colour and pH for segregating beef carcasses into tenderness groups. *Meat Sci.*, 30: 97-114.
- JONES, B. K. e TATUM, J. D., 1994. Predictors of beef tenderness among carcasses produced under commercial conditions. *J. Anim. Sci.*, 72: 1492-1501.
- KEANE, M. G. e ALLEN, P., 1998. Effects of production system intensity on performance, carcass composition and meat quality of beef cattle. *Liv. Prod. Sci.*, 56: 203-214.
- KOPP, J., 1976. Tendreté de la viande bovine. Principaux facteurs de variation liés à l'âge des animaux. *Bull. Techn. C. R. Z. V. Theix I.N.R.A.*, 24: 37-46.
- LEE, Y. B. e ASHMORE, C. R., 1985. Effect of early postmortem temperature on beef tenderness. *J. Anim. Sci.*, 60(6): 1588-1596.

- LEMONS, J. P. C. 1997. Crescimento, Características da Carcassa e da Carne de Bovinos das Raças Alentejana, Barrosã, Mertolenga e Frísia Produzidos em Pastoreio. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- MACDOUGALL, D. B., 1982. Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chemistry*, 9: 75-88.
- MAY, S. G., DOLEZAL, H. G., GILL, D. R., RAY, F. K. e BUCHANAN, D. S., 1992. Effect of days fed, carcass grade traits, and subcutaneous fat removal on postmortem muscle characteristics and beef palatability. *J. Anim. Sci.*, 70: 444-453.
- McKEITH, F.K., SAVELL, J.W. e SMITH, G.C., 1985. Physical, chemical, histological and palatability characteristics of muscles from three breed-types of cattle at different times-on-feed. *Meat Sci.*, 15: 37-50.
- McKORMICK, R. J., 1994. The flexibility of the collagen compartments of muscle. *Meat Sci.*, 36: 79-92.
- MICOL, D., ROBELIN, J. e GEAY, Y., 1993. Composition corporelle et caractéristiques biologiques des muscles chez les bovines en croissance et à l'engrais. *INRA Prod. Anim.*, 6(6): 61-69.
- MILLER, M. F., CROSS, H. R. , CROUSE, J. D. e JENKINS, T. G., 1987. Effect of feed intake on collagen characteristics and muscle quality of mature cows. *Meat Sci.*, 21: 287-294.
- MONIN, G., 1991. Facteurs biologiques des qualités de la viande bovine. *INRA Prod. Anim.*, 4(2): 151-160.
- Norma Portuguesa, NP-1987. Carnes derivados e produtos cárneos. determinação do teor de L-Hidroxiprolina. Método de Referência.
- OLSON, D. G. e PARRISH, F. C., 1977. Relationship of myofibril fragmentation index to measures of beefsteak tenderness. *J. Food Sci.*, 42: 506-509.
- PAGE, J. K., WULF, D. M. e SCHWOTZER, T. R., 2001. A survey of beef muscle colour and pH. *J. Anim. Sci.*, 79: 678-687.
- POWELL, V. H., 1991. Quality of beef loin steaks as influenced by animal age, electric stimulation and ageing. *Meat Sci.*, 30: 195-205.
- PROST, E., PELCZYNSKA, E. e KOTULA, A. W., 1975. Quality characteristics of bovine meat. II. Beef tenderness in relation to individual muscles, age and sex of animals and carcass quality grade. *Anim. Prod.*, 41(2): 540-547.
- PURCHAS, R. W., 1990. An assessment of the role of pH differences in determining the relative tenderness of meat from bulls and steers. *Meat Sci.*, 27: 129-140.
- PURCHAS, R. W. e AUNGSUPAKORN, R., 1993. Further investigations into the relationship between ultimate pH and tenderness for beef samples from bulls and steers. *Meat Sci.*, 34: 163-178.
- REAGAN, J. O., CARPENTER, Z. L., SMITH, G. C. e KING, G. T., 1971. Comparison of palatability traits of beef produced by young bulls and steers. *J. Anim. Sci.*, 32 (4): 641-646.
- RENERRE, M., 1982. La couleur de la viande et sa mesure. *Bull. Techn. C.R.Z.V. Theix I.N.R.A.*, 47: 47-54.

- RILEY, R.R., SAVELL, J. W., MURPHEY, C.E., SMITH, G.C., STIFFER, D.M. e CROSS, H.R., 1983. Palatability of beef from steers and young bull carcasses as influenced by electrical stimulation, subcutaneous fat thickness and marbling. *J. Anim. Sci.*, 56(3): 592-597.
- SANTOS SILVA, J., MENDES, I. A. e BESSA, R.J.B., 2002. Effect of genotype system and slaughter weight on the quality of light lambs. I. Growth, carcass composition and meat quality. *Liv. Prod. Sci.*, 76:17-25.
- SCHNEIJENBERG, T. C. e EIKELNBOM, G., 1990. Beef quality and palatability of cows and young bulls. 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Association of Animal Production, Toulouse, França.
- SEIDEMAN, S. C., CROSS, H. R. , OLTJEN, R. R. e SCHANBACHER, B. D., 1982. Utilization of the intact male for red meat production: a review. *J. Anim. Sci.*, 55: 826-840.
- SEIDEMAN, S.C., KOOHMARAIE, M. e CROUSE, J.D., 1987. Factors associated with tenderness in young beef. *Meat Sci.*, 20: 281-291.
- SHACKELFORD, S.D., PURSER, D.E., SMITH, G.C., GRIFFIN, C.L., STIFFLER, D.M. e SAVELL, J., 1992. Lean Color characteristics of bullock and steer beef. *J. Anim. Sci.*, 70: 465-469.
- SILVA, M. F., (1996). Crescimento, características da carcaça e qualidade de carne de raças autóctones. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- SMULDERS, F.J.M., MARSH, B.B., SWARTZ, D.R., RUSSELL, R.L. e HOENECKE, M. E., 1990 Beef tenderness and sarcomere length. *Meat Sci.*, 28: 349-363.
- TARRANT, P. V. e SHERINGTON, J., 1980. An investigation of ultimate pH in the muscles of commercial beef carcasses. *Meat Sci.*, 4: 287-297.
- TOURAILLE, C., 1991. Qualités organoleptiques des viandes bovine et ovine. Calidad de la canal y de la carne en ruminantes. Saragoça, Espanha. Policopiado.
- WARNER, R. D., 1989. Objective description of meat and fat colour in beef carcasses. In: L. E. Brownlie, W. J. A. Hall and S. U. Fabiansson (Eds.), *The automated measurement of beef*. The Australian Mear and Livestock Corporation, Sidney, Austrália. pp. 145-154.
- WIERBICKI, E., CAHILL, V. R., KUNKLE, L. E., KLOSTERMAN, E. W. e DEATHRAGE, F. E., 1955. Effect of castration on biochemistry and quality of beef. *Agricultural and Food Chem.*, 3: 244-249.
- WISMER-PEDERSEN, J., 1994. Química de los tecidos animais - Agua. In: J.F. Price and B.S. Schweigert (Eds), *Ciencia de la carne e de los productos carnicos*. Editorial Acribia S. A., Zaragoza, pp. 125-138.
- WOOD, J. D., 1990. Consequences for meat quality of reducing carcass fatness. In: J. D. Wood and Fisher A. V. (Eds), *Reducing fatness in meat animals*. Elsevier Applied Sci. Publishers Ltd., Londres, Reino Unido.



# TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF THE GILTHEAD SEA BREAM (*SPARUS AURATUS*) PITUITARY GLAND: TYPE I MARKERS FOR MOLECULAR GENETICS

B. E. P. LOURO, A. L. S. PASSOS and D. M. POWER<sup>1</sup>

Laboratory of Comparative and Molecular Endocrinology, CCMAR, CIMAR Laboratório  
Associado, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

<sup>1</sup>to whom correspondence should be addressed

Centro de Ciências do Mar, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro,  
Portugal-Tel: +351-289800100 ext 7335; Fax: +351-289818419

Email: dpower@alg.pt

(Recepção: 8 de Setembro de 2005; Aprovado: 6 de Outubro de 2005)

## ABSTRACT

The pituitary gland of vertebrates produces a number of hormones, growth hormone (GH), prolactin (PRL), somatolactin (SL), gonadotrophin (GTH), thyroid stimulating hormone (TSH), and proopiomelanocorticotrophin (POMC), which regulate a range of important production traits. In the present study a gilthead sea bream (*Sparus auratus*) pituitary cDNA library was arrayed (948 clones) in 96 well plates and used to generate expressed sequence tags (ESTs) for pituitary hormones and novel pituitary transcripts. Using a combination of colony blotting and sequencing 750 clones were analysed, 61 ESTs were isolated for the first time in *Sparus auratus*, 12 ESTs were identified for the first time in teleosts and 70 ESTs which corresponded to 58 genes were unidentified. In addition to isolating ESTs for all the pituitary hormones, four novel transcripts with high levels of expression in the pituitary gland were also identified. The present data contribute to an ongoing European project (Bridgemap, [www.bridgemap.tuc.gr](http://www.bridgemap.tuc.gr)) which aims to generate molecular resources for implementation of a selective breeding program for gilthead sea bream in Europe.

**Key -words:** BridgeMap, expressed sequence tags, novel pituitary transcripts, pituitary cDNA library, *Sparus auratus*, type I markers

## INTRODUCTION

The diversification of aquaculture species is dependent on the establishment of sustainable production and depends on successful reproduction and completion of the life cycle in captivity (Donaldson, 1997). Molecular resources are currently available for a limited number of teleost fish used for aquaculture such as, winter

flounder, (*Pleuronectes americanus*, Douglas *et al.*, 1999), carp (*Cyprinus carpio*, Savan and Sakai, 2002), channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Karsi *et al.* 1998; Liu *et al.*, 1999), salmon ([www.salmongenome.no/cgi-bin/sgp.cgi](http://www.salmongenome.no/cgi-bin/sgp.cgi)) and trout (*Oncorhynchus mykiss*, Kono *et al.*, 2000). The principle resources developed for important aquaculture species are type I (genes) and type II (microsatellite) molecular markers for gene mapping, marker assisted selection (MAS) and also for genetic analysis of populations. However, so far relatively few selection programs exist for fish and their evolutionary diversity coupled with economic considerations represent a significant barrier to the implementation of molecular genetics in aquaculture.

The present study aimed to establish a technically simple, quick and relatively cheap method to characterise active genes in the transcriptome of the pituitary gland of *Sparus auratus*, an important Southern European aquaculture species and a member of the Sparidae, to which a number of other species of commercial interest belong eg. *Dentex dentex*, *Pagrus pagrus*, *Diplodus sargus*, *Diplodus puntazzo*, *Lithognathus mormyrus*, *Pagellus erythrinus*, *Pagellus bogaraveo*, *Pagrus pagrus*, *Pagrus aurita*, *Pagrus caeruleostictus*. The pituitary gland was chosen as in vertebrates it produces a range of hormones which regulate important production traits (Gelderman, 1975; Van Laere *et al.*, 2003). A rapid method based upon the generation of a pituitary macroarray, identification by specific hybridisation of clones corresponding to abundant pituitary hormones and then sequencing of non-hormone genes was developed.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of pituitary Macroarray

A *Sparus auratus* pituitary cDNA library ( $1 \times 10^6$  primary recombinants with an average insert size of 1000bp) was constructed using the UNI-ZAP XR cloning kit (Stratagene, La Jolla, CA) and mRNA extracted from pituitary glands ( $n = 30$ ) of adult *Sparus auratus* ( $600 \text{ g} \pm 25\text{g}$ ) (full method given in Santos *et al.*, 1999).

In order to convert the  $\lambda$  libraries into plasmid libraries a mass in vivo excision procedure was carried out. XL1-Blue MRF' bacteria were resuspended in 10 mM  $\text{MgSO}_4$  to a final  $\text{OD}_{600}$  of 0.6 and the *Sparus auratus* pituitary library in lambda

bacteriophage (ratio 1:10 phage-to-bacteria) and helper phage (10:1 helper phage-to-bacteria) were added. Absorption of bacteriophage to bacteria was carried out at 37°C for 15 minutes, heat inactivated (65-70°C for 20 min), cell debris removed and used to transform SOLR cells. After overnight incubation individual colonies were picked into ten, 96 well plates containing 100ml of LB broth and ampicillin (50 µg/ml) and grown as static cultures at 37°C and 40ml of glycerol (50%w/v) added prior to storage at -20°C. Fifty clones were selected at random from the arrayed library and DNA isolated for sequencing. The quality of the macroarray and the sequencing was assessed using these clones and hormone specific cDNA were also identified.

Plasmid DNA was prepared using the alkaline lysis procedure (Birnboim and Doly, 1979) and then extracted with phenol. The insert was sequenced with an automated sequencer (ABI 373) using the T3 sequencing primer in the polylinker of pBluescript II SK(+/-) which flanked the 5' region of the cDNA insert. cDNA inserts were sequenced once and had an average length of 600 bases and each constituted an expressed sequence tag (EST).

### **Macroarray hybridisation and EST generation**

Isolated colonies were spotted in duplicate onto nylon membrane (Hybond-N, Amersham Biosciences, Lisbon, Portugal) using a 96 well replicating tool. Membranes were placed, colony side upwards, on LB agar and incubated overnight at 37°C and used for colony blotting (Grunstein and Hogness, 1975). Membranes were washed with SDS (4%), denatured (1.5M NaCl/0.5M NaOH), neutralized (1.5M NaCl/0.5M Tris, pH 7.2/1mM EDTA) and washed briefly (2x SSC) before baking for 2hr at 80°C.

To identify clones containing cDNA of abundant genes encoding the pituitary hormones (target cDNA) a set of membranes was hybridized in series with [<sup>32</sup>P]dCTP labeled probes specific for *Sparus auratus* prolactin (PRL), growth hormone (GH), somatolactin (SL) and proopiomelanocortin (POMC). Probes corresponded to full-length cDNA and were available in house (PRL, GH, Santos *et al.* 1999) or were identified among the initial 50 clones randomly selected and sequenced to assess macroarray quality. Membranes were prehybridised in Church-Gilbert solution (Church and Gilbert, 1984) at 58°C for 2 hours and then hybridised overnight at the same temperature in Church-Gilbert to which labeled probe had been added. High stringency washes were carried out at 58°C using 2 x SSC/0.1%SDS (2 x 10 minutes), 1 x SSC/0.1%SDS (2 x 15 minutes) and 0.1 x SSC/0.1%SDS (1 x 20minutes).

Positive signals were detected after probe hybridisation by exposure of membranes to autoradiography film (X-OMAT, Kodak) with an intensifying screen. Specificity of probe hybridization was established by sequencing 10-20 positive clones for SL and POMC and 5-10 clones of GH and PRL. Sixty percent of the macroarray clones were hormone-encoding cDNA. Almost half (48.3%) of the clones, which failed to hybridise with hormone probes, were randomly selected and sequenced.

The length of sequence obtained was approximately 600bp. Prior to sequence analysis quality was assessed (poor sequences were rejected) and the vector and polylinker sequence were clipped. Sequence identity was determined using the NCBI BLAST server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) using the BlastX and Blastn algorithms (Altschul *et al.*, 1994) against the non-redundant nucleotide database (nr db). Matches were considered to be significant when approximately 300 bp of the sequenced EST had an E-value of  $< 1e^{-5}$ . To establish EST homologues, sequences were also submitted to Blastn searches against the GenBank EST databases and homologues defined as those with an E-value of  $< 1e^{-5}$  and a score of  $>40$  (Martins *et al.*, 2001). The resulting sequences were compared to each other using "stand-alone" Blastn (Altschul *et al.* 1994) and identical sequences clustered and clusters classified following the recommendations of the Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org/>). Multiple sequence alignment using ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) was carried out using the most abundant pituitary hormone ESTs for a higher cluster resolution.

### **Characterisation of tissue specificity of unidentified clones**

In order to determine if unidentified clones (those in which sequence similarity searches failed to give a putative identity) were pituitary specific RT-PCR was carried out. The sequence obtained for each clone was introduced into primer3\_www.cgi v0.2 ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) and specific primers were designed. It was not possible to generate functional primers for all 58 unidentified pituitary transcripts and so only 35 were analysed in this study. A panel of cDNAs from *Sparus auratus* liver, heart, kidney, brain, white muscle, skin, gonads, gill arches, spleen, duodenum, caudal fin bone and pituitary was prepared. In brief, cDNA was synthesised from 1 mg of total RNA in a 40µl reaction containing 0.05M Tris-HCl, pH8.3, 0.075M KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 0.25mM dNTP, 0.1 mg/ml pd(N)<sub>6</sub>, RNAase inhibitor (3.2U; Amersham Pharmacia) and M-MLV reverse

transcriptase (20U; Gibco BRL, Barcelona), for an hour and a half at 37°C. PCR was carried out in a 10µl reaction containing 0.1mg of tissue cDNA, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 40µM dNTP, 0.3pmol of forward primer, 0.3pmol of reverse primer and Taq DNA polymerase (1.25U; Promega, Madison, WI), sterile water substituted cDNA in control reactions. In order to confirm a similar quantity of tissue cDNA was utilised in PCR reactions, a second amplification reaction of the house-keeping gene, elongation factor alpha (EF1a; Nowell *et al.*, 2000) was also carried out for each tissue cDNA. The PCR cycle utilized consisted of 2min at 94°C followed by 28 cycles of denaturing (94°C, 30 s), annealing (57°C, 30s), and extension (72°C, 30s). Control reactions in which reverse transcriptase was omitted from cDNA synthesis or in which cDNA was substituted with water in PCR reactions failed to give an amplified product. The presence or absence of reaction products was analysed on a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide (0.5mg/ml). Gel images were collected using a Pharmacia Biotech ImageMaster® VDS system with Liscap® capture software and constant photographic parameters. Signal intensities for PCR products were quantified by densitometric analysis using ImageMaster 1D prime software v. 3.00, Pharmacia and the ratio of unidentified target mRNA/EF1-alpha in each sample was calculated and divided in three relative expression classes: low ( $0 \leq 0.33$ ), high ( $0.33 \leq 0.66$ ), and very high ( $0.66 \leq 1$ ).

## RESULTS

### Gene expression profile of *Sparus auratus* pituitary gland

Of the 948 clones analysed by colony blotting those encoding pituitary hormones were most abundant and accounted for 60 % (567 clones) of all clones in the macroarray. The hormones identified and their relative abundance in the macroarray were GH (10.3%), PRL (3.3%), SL (33.1%) and proopiomelanocorticotrophin (POMC; 13.1%). One hundred and eighty four, 5' ESTs were generated by randomly selecting and sequencing the non-hormone clones (Table 2), of these 114 corresponded to 65 known genes and were categorized according to cellular localisation of their products and the frequency of representation in the macroarray was noted (Table 2). Of all the known genes identified 61 were isolated for the first time in *Sparus auratus* and 12 were identified for the first time in teleosts while 70 ESTs which corresponded to 58 genes were unidentified (Table 2) with the present analysis. The ESTs generated from the pituitary macroarray have been deposited in GeneBank (accession numbers

**TABLE I - SEQUENCE OF THE PCR PRIMERS UTILISED TO AMPLIFY PITUITARY HORMONE TRANSCRIPTS AND ALSO UNIDENTIFIED PITUITARY ESTs IN A RANGE OF DIFFERENT *SPARUS AURATUS* TISSUE. THE PRIMERS PAIRS ALBEIT DIFFERENT WERE ALL OPTIMISED FOR AN ANNEALING TEMPERATURE OF 57 °C AND AMPLIFIED A PRODUCT BETWEEN OF 150-500BP.**

Transcripts	Genebank Accession Nº	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
GH	AY038038	GCCCCATCGACAAGCACG	CTACATTTTGCCACCGTCAG
SL	Y11144 L49205	GGAGTTCTGACATGCTGCT	CGCTGTACGTTGTGGTCATC
PRL	AF060541	ACGGTGTGTGTCATGCTGGC	AGATGGCCTGAGCTGCTGGA
POMC	CB227624 CB227626	TGGAGTGCATCCAGCTCTGTCT	CTGCTCCAGCGGAAGTGT
TSHb	CB227560	ACCCACTGACTTCACCTGT	GGCCGAGTATGTCCCTCA
GHbII	CX244519	CCAAGGACCCAGTGATGAA	GACGTGTCCATAGCACAGA
GHa	AF300425	CCCGAAGAACATCACCTC	TCTGGCAACACAAGAACAC
Unknown	DN048404	CAAAGTACGCCAACCTCACC	CCCTAGTTCCCGCATCATC
	CX244472	CCCATGAAGACCCAGGAG	AAGAGCAGCAGGGCAGAG
	CX244488	GACTAACTGTGTGACGCTCTCA	CCGGGGTTTTAATACAGG
	CX244500	TCACTTCTGTGACCAATCAG	CTGTGGTTCACCACTCAA
	CX244530	GATATGAGGAGCATTCACAGC	TTTCCACAGCATCAGCTC
	CB227588	CAGCGAGAGGAGAGTCAACC	GTTCCTCAGACAGGGCACACA
	CB227601	AGGGTGTTTTGGGGACAC	ACCAGAGGGAAAGCAGGA
	DN048399	GACCGAGCATGTGACGAG	GGGAGGGTCTGTTAATCGAG
	CB227581	GCCAGATGGTCTCGAAATG	TTACCGGTACAGTCTACCT
	CB227579	CTGCATTGACTGTGGGAGA	ATGACTCCGAAGCGAAACAC
	CB227593	GGTGCAACCCACCTAACAC	GTTCCTCCCCACAGATAGC
	CB227603	GGGGCTTAACAAGTGCAG	CTTTGGCAGGCTTCATC
	CB227606	GCTTGGTCCCTTATTCG	CCACTGAGATGCGTCCAT
	CB227608	GACCACTTGAGGCTTGAAC	CTGCCTGCACAACAGTGAAT
	DN048390	AGGGCATGTGTGGAGGAAC	GCACTCCATGTGGCTTCAG
	DN048398	GCCAGCATCACGAGTTTG	GAGCAACAGGGGACAAGG
	DN048405	GTCAGAAATGGGTCCGCTAA	CGTCAGAAATGGGTCCGCTAA
	CX244466	CGCCAGTTTCTCCGTTGT	CGCCAGTTTCTCCGTTGT
	CX244471	AAGCTGAAGCCAGCCAAT	AAGCTGAAGCCAGCCAAT
	CX244476	CAGATGCCAGCCGAGAAC	GTGGGGTGTGGGTGTGT
	CX244480	GAAGAGGGGAGTGAGGAGAG	CCTGGAGTCAGCAAACAGG
	CB227611	GTCAGCGAGCGAATCTCAAC	GGGCCAACGACTGTTATGG
	CX244463	CCCATGCCTCCTCAGTTCT	GGAAACAAGTGGCAACAC
	CX244468	CAGCCTCCAAATGGCAAC	ACAGTCCGCCACAGGTA
	CX244510	TGCACTGTTCGGTTTGA	GAGCTTTGGATCTGGGACTG
	CX244514	AGGTCAAACTCCTCCAGTC	GTCATTCCCGATACCAAACC
	CX244473	CAGCCGGTATGAAGAGAGGA	GTAACACAGCTGGTGGAGGC
	CX244522	TCGGGGAATACTGTGGTCT	GATTGTGGTGGGGCTGT
	CB227550	GGTGTTCGCTGGGAGGAAC	ACGGATCTGACGGTCTG
	CB227552	CTCCTCCAACAGGCACCTAC	GTCAGGCCACACATCCAAC
	CB227554	CGGTGTAAGTCCACAAGG	GCAGCATCCAGCAGTAGT
	CB227556	AAAGAGCACTCGGTGGTAG	TGACAGAAGGGCCAGGTT
	CB227557	GTCGTGGTGTTCATCTGTGG	GGCTGACTGCAGGTGTGA
	CB227575	GCAAGAGGAGGCTGTGGAG	CCAGTGAAGGGACAGACA
	CB227571	CAGGCTGTCAAGCGATAA	TGCCCTAGGACGTGTAGCAA

indicated in table 2). Grouping of genes according to cellular localisation revealed that after hormones the second most abundant group corresponded to cDNA encoding mitochondrial proteins, the cytochrome-c-oxidases were particularly abundant. The third major group included translational machinery proteins such as large and small ribosomal proteins (Figure. 1).

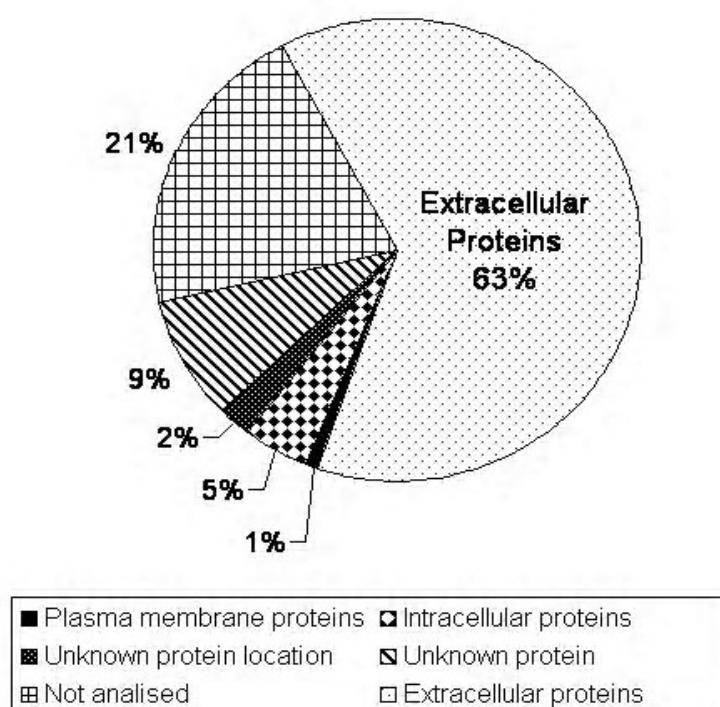


Figure 1. Scheme categorizing the transcripts identified in the *Sparus auratus* pituitary transcriptome based upon cellular localisation. ESTs were subject to BlastX and the protein products grouped according to cellular location, determined using GenBank+EMBL+ DDBJ+PDB "non-redundant" databases. The principal cellular localisations considered were; extracellular proteins, this group was principally composed of pituitary hormones (62%) and other extracellular proteins were a minor component (1%); plasma membrane proteins (1%) and intracellular proteins (5%). It was not possible to define the cellular location of some identified ESTs as they had an unknown protein location (2%). ESTs in which similarity searches failed to identify the protein product and unsequenced clones in the macroarray corresponded to 21%.

**TABLE II** - ESTs GENERATED FROM THE *SPARUS AURATUS* PITUITARY MACROARRAY (50 HORMONE ESTs GENERATED AS POSITIVE CONTROL FOR SPECIFICITY OF PROBE HYBRIDIZATION \*). PUTATIVE GENE IDENTIFICATION WAS ESTABLISHED BY INTERROGATING THE NCBI NUCLEOTIDE DATABASE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) USING BLASTX (OR BLASTN \*\*). THE SIMILARITY SCORE (BITS) AND E VALUE AS IS THE ORGANISM POSSESSING THE SEQUENCE WITH THE GREATEST SIMILARITY IS GIVEN. CELLULAR LOCALISATION OF ESTs WAS EVALUATED USING THE RECOMMENDATIONS OF THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM (<http://www.geneontology.org/>).

Accession N°	EST Identification clustered by cellular localisation	Freq- uency	Most blastX - Score (bits) / E Value (Closest species)
<b>1. Extracellular proteins</b>		81	
<b>1.1. Secretory</b>		80	
<b>1.1.1. Pituitary hormones</b>		76	
CB227626	Proopiomelanocortin A *	4	272/ 7e <sup>-072</sup> <i>Epinephelus coioides</i>
CX244494	Proopiomelanocortin B *	12	284/ 2e <sup>-075</sup> <i>Acanthopagrus latus</i>
Y11144	Somatolactin (SAS)*	19	468/ e <sup>-131</sup> <i>S. auratus</i>
L49205	Somatolactin (STS)*	15	465/ e <sup>-130</sup> <i>S. auratus</i>
AF060541	Prolactin (PRL)*	9	425/ e <sup>-118</sup> <i>S. auratus</i>
AF300425	Gonadotropin $\alpha$ subunit	6	385/ 1e <sup>-059</sup> <i>S. auratus</i>
DN048396	Gonadotropin II beta subunit	2	179/ 3e <sup>-044</sup> <i>Pagrus major</i>
CB227560	Thyrotropin $\beta$ subunit	4	238/ 8e <sup>-062</sup> <i>Oncorhynchus mykiss</i>
AY038038	Growth hormone (GH)*	5	375/ e <sup>-102</sup> <i>S. auratus</i>
<b>1.1.2 Other secretory proteins</b>		4	
CX244535	Neuronal activity-regulated pentraxin	1	149/ 8e <sup>-035</sup> <i>Tetraodon nigroviridis</i>
CX244465	Apolipoprotein E	1	228/ 6e <sup>-059</sup> <i>O. mykiss</i>
CX244485	Cystatin	2	112/ 1e <sup>-023</sup> <i>T. nigroviridis</i>
<b>1.2. Matrix proteins</b>		1	
CB227621	Acidic secreted protein in cartilage (ASPIC)	1	314/ 1e <sup>-084</sup> <i>T. nigroviridis</i>
<b>2. Plasma membrane proteins</b>		7	
CX244513	Type III iodothyronine deiodinase	1	149/ 4e <sup>-037</sup> <i>Oreochromis niloticus</i>
CB227545	AMPA receptor subunit GluR3B	1	260/ 1e <sup>-072</sup> <i>D. rerio</i>
AAO86517	Thyroid hormone receptor $\beta$	1	80/ 2e <sup>-014</sup> <i>S. auratus</i>
CB227629	Growth hormone inducible transmembrane protein	1	172/ 1e <sup>-050</sup> <i>Xenopus laevis</i>
CB227584	Phospholipase A2 group I	1	74 / 4e <sup>-010</sup> <i>Chrysophrys major</i> **
CX244509	MHC class II invariant chain-like protein	1	222/ 2e <sup>-057</sup> <i>Siniperca chuatsi</i>
CX244512	Solute carrier family 35, member B4	1	108/ 8e <sup>-025</sup> <i>T. nigroviridis</i>



<b>3. Intracellular proteins</b>		43	
<b>3.1. Nuclear proteins</b>		8	
CB227544	Similar to Zinc finger protein 228	1	207/ 1e <sup>-052</sup> <i>Canis familiaris</i>
CX244526	Zinc finger protein 238	1	129/ 3e <sup>-029</sup> <i>T. nigroviridis</i>
CB227564	Id2 Protein	1	218/ 1e <sup>-055</sup> <i>O. Mykiss</i>
CB227568	Similar to transcription elongation factor B	1	262/ 5e <sup>-069</sup> <i>Rattus norvegicus</i>
CB227586	Similar to SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin	1	206/ 3e <sup>-052</sup> <i>T. nigroviridis</i>
X81646	GHF-1/PIT-1, pituitary transcription factor	2	165/ 1e <sup>-039</sup> <i>S. auratus</i>
AF184170	Elongation factor 1-alpha (EF1-alpha)	1	437/ e <sup>-129</sup> <i>S. auratus</i>
<b>3.2. Mitochondrial proteins</b>		15	
-	Cytochrome b	2	347/ e <sup>-116</sup> <i>S. auratus</i>
CB227570	Mitochondrial inner membrane translocating protein (timm23)	1	137/ 1e <sup>-031</sup> <i>T. nigroviridis</i>
-	Ndufs1-prov protein	1	95/ 1e <sup>-018</sup> <i>Xenopus laevis</i>
-	Cytochrome c oxidase subunit I	2	343/ 2e <sup>-093</sup> <i>Galaxias maculatus</i>
-	Ubiquinol-cytochrome c reductase core I	1	326/ e <sup>-108</sup> <i>T. nigroviridis</i>
-	Solute carrier family 25 alpha, member 5 (slc25a5)	1	442/ e <sup>-123</sup> <i>T. nigroviridis</i>
-	Cytochrome-c-oxidase II	4	350/ 1e <sup>-095</sup> <i>Cataetys rubrirostris</i>
-	Cytochrome oxidase III	2	229/ e <sup>-106</sup> <i>Pagrus auriga</i>
-	ATPase subunit 8 (ATPase8)	1	95/ 3e <sup>-020</sup> <i>P. auriga</i>
<b>3.3. Cytoplasmic proteins</b>		18	
<b>3.3.1. Ribosomal proteins</b>		9	
CB227622	ribosomal protein L10	1	51/ 4e-014 <i>Ictalurus punctatus</i>
CB227558	Ribosomal protein S25	1	152/ 2e-036 <i>T. nigroviridis</i>
CB227569	Similar to 60S ribosomal protein L18a	1	356/ 3e-097 <i>T. nigroviridis</i>
CX244470	Ribosomal protein S7	2	365/ e-100 <i>Takifugu rubripes</i>
CB227591	Ribosomal protein P1	1	125/ 3e-028 <i>D. rerio</i>
CX244461	60S ribosomal protein L24	1	227/ 1e-058 <i>Pagrus major</i>
CX244496	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 (Uba52)	1	249/ 1e-065 <i>Homo sapiens</i>
CX244523	Ribosomal protein L28	1	118/ 4e <sup>-026</sup> <i>Hippocampus comes</i>

<b>3.3.2. Cytoskeletal proteins</b>		7	
CX244462	Receptor for activated protein kinase C (RACK1)	2	299/ $e^{-126}$ <i>P. major</i>
CX244493	Beta-actin protein	4	371/ $e^{-114}$ <i>Epinephelus coioides</i>
CX244520	Similar to MAP1 light chain 3-like protein 2	1	238/ $2e^{-61}$ <i>T. nigroviridis</i>
<b>3.3.3. Others</b>		2	
CB227573	Similar to Gdi-1 for complex RhoGDI-1	1	248/ $1e^{-066}$ <i>D. rerio</i>
CX244534	Alpha 4 subunit of 20S proteasome	1	421/ $e^{-116}$ <i>T. nigroviridis</i>
<b>4. Unknown location</b>		22	
CB227555	Similar to KIAA1076 protein [Homo sapiens]	1	295/ $3e^{-079}$ <i>T. nigroviridis</i>
CB227576	similar to calmodulin regulated spectrin-associated protein 1	1	60/ $2e^{-008}$ <i>Gallus gallus</i>
CB227594	Carbamoyl-phosphate synthetase III	1	137/ $5e^{-031}$ <i>Alcolapia grahami</i>
CB227596	cAMP-dependent protein kinase type I regulatory subunit	1	161/ $3e^{-074}$ <i>Gallus gallus</i>
CB227597	Like Gi2 alpha subunit	1	64/ $3e^{-007}$ <i>Oryzias latipes</i> **
CB227607	Similar to Glcc1; Glucocorticoid induced transcript 1 [Mus musculus]	1	98/ $1e^{-019}$ <i>T. nigroviridis</i>
CB227610	ADP-ribosylation factor (ARF3)	1	234/ $2e^{-060}$ <i>Rattus norvegicus</i>
DN048391	NY-REN-58 antigen	1	130/ $3e^{-029}$ <i>Canis familiaris</i>
DN048393	Dachshund C protein (Dach1)	1	152/ $4e^{-036}$ <i>T. nigroviridis</i>
DN048394	KIAA1411 protein	1	291/ $6e^{-078}$ <i>T. nigroviridis</i>
CX244515	Enhancer of polycomb homolog 1, (Epc1), transcript variant 2 [Drosophila]	2	120/ $2e^{-026}$ <i>T. nigroviridis</i>
CX244490	protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)	1	458/ $e^{-128}$ <i>T. nigroviridis</i>
CX244498	5-aminolaevulinic acid dehydratase	1	422/ $e^{-117}$ <i>T. nigroviridis</i>
CX244501	Hypothetical Protein TonB-dependent receptor protein containing protein	1	236/ $3e^{-059}$ <i>D. rerio</i> **
CX244502	similar to Osmotic stress protein 94 (Heat shock 70-related protein APG-1)	1	405/ $e^{-120}$ <i>T. nigroviridis</i>
CX244521	Fatty acid binding protein H6-isoform (H6-FABP)	1	130/ $8e^{-031}$ <i>T. nigroviridis</i>
CX244544	Similar to RNA polymerase common subunit RPB6	1	48/ $7e^{-005}$ <i>Gallus gallus</i>
CX244489	Intestinal mucin 3	1	67/ $2e^{-010}$ <i>Mus musculus</i>

417_	Mucin 1 precursor	1	160/ 4e <sup>-038</sup> <i>T. nigroviridis</i>
CX244514	similar to mastermind-like 2	1	116/ 2e <sup>-030</sup> <i>T. nigroviridis</i>
CX244473	super cysteine rich protein; SCRP	1	22/ 7e <sup>-008</sup> <i>Homo sapiens</i>
<b>5. Others</b>		11	
CB227559	Reverse transcriptase pseudogene (ZfL3 LINE)	1	128/ 1e <sup>-027</sup> <i>D. rerio</i> **
-	Mitochondrial 16S rRNA	1	839/ 0.0 <i>S. auratus</i> **
CX244472	Predicted gene Zgc:92146	1	72/ 9e <sup>-012</sup> <i>D. rerio</i>
CX244474	clone DKEY-28J24 in linkage group 21	1	62/ 1e <sup>-006</sup> <i>D. rerio</i> **
CX244469	Rex retrotransposon, D locus-related sequence	1	74/ 6e <sup>-010</sup> <i>Xiphophorus maculatus</i> **
CB227557	CAF89452.1 unnamed protein product	1	64/ 4e <sup>-010</sup> <i>T. nigroviridis</i>
CX244522	CAF97170.1 unnamed protein product	1	187/ 3e <sup>-046</sup> <i>T. nigroviridis</i>
CB227616	CNS0G9B4 full-length cDNA	1	88/ 3e <sup>-014</sup> <i>T. nigroviridis</i> **
CB227603	CNS0FUWS full-length cDNA	1	66/ 1e <sup>-007</sup> <i>T. nigroviridis</i> **
CB227579	CNS0GSZ4 full-length cDNA	1	72/ 1e-009 <i>T. nigroviridis</i> **
CB227556	CNS0FXGZ full-length cDNA	1	66/ 1e <sup>-007</sup> <i>T. nigroviridis</i> **
<b>6. Unidentified</b>		70	
<b>TOTAL</b>		234	

Cluster analysis of the pituitary hormone ESTs generated from *Sparus auratus* pituitary and existing sequences deposited in genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was carried out by multiple sequence alignment using ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). This analysis revealed that a single cluster existed respectively for GH, PRL, GTH (*alpha* subunit) and GTH II (*beta* subunit) indicating the existence of a single cDNA transcript in the *Sparus auratus* for each of these hormones. In contrast, the ESTs of SL and POMC generated respectively 2 independent clusters indicating the existence of 2 different cDNAs for each of these hormones.

### Tissue specificity of unidentified clones

The determination of the tissue distribution of unidentified *Sparus auratus* ESTs (n = 35) by RT-PCR demonstrated that the majority of transcripts had a ubiquitous tissue

TABLE III - RELATIVE EXPRESSION OF UNIDENTIFIED ESTs IN A *SPARUS AURATUS* cDNA TISSUE ARRAY. THE RELATIVE LEVEL OF EXPRESSION OF EACH TRANSCRIPT IN THE cDNA TISSUE ARRAY WAS CALCULATED USING THE RATIO BETWEEN THE EST BEING STUDIED AND EF1- $\alpha$  WHICH SERVED AS A CONTROL FOR THE QUANTITY OF cDNA USED IN RT-PCR REACTIONS. K - KIDNEY; L - LIVER; SP - SPLEEN; D - DUODENUM; SK - SKIN; H - HEART; WM - WHITE MUSCLE; B - BONE; BA - BRANCHIAL ARCHES; BR - BRAIN; G - GONADS; P - PITUITARY. THE RELATIVE EXPRESSION LEVELS WERE CLASSIFIED AS: - NULL; + LOW; ++ HIGH; +++ VERY HIGH AND NA - NOT ANALYSED.

Accession Nº	Tissues											
	K	L	Sp	D	Sk	H	WM	B	BA	Br	G	P
Differential Expression												
DN048404	-	-	-	+	++	+	+	+	-	-	+	+++
CX244472	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-
CX244488	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	++	+++
CX244500	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+++	++	++
CX244530	-	-	+	-	+++	-	-	-	-	+++	++	++
DN048390	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CX244473	+++	-	+++	-	-	-	-	+	+	+++	+++	+
CB227601	++	-	+	++	++	-	++	-	+	++	-	+
Ubiquitous High Expression												
CB227588	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CB227579	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
CB227606	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CB227608	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DN048398	+++	+	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DN048405	++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++
CX244466	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CX244471	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CB227611	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CX244463	++	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
CX244468	+	+	++	++	+	++	++	++	++	+++	++	++
CX244510	++	+	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
DN048399	-	-	++	++	+++	++	+++	++	++	+++	++	++
CB227581	-	-	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Ubiquitous Low Expression												
CB227593	+	+	++	+	+	+	+++	+	+	+	+	+
CX244514	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+
CX244476	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CX244480	+	+	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+
CB227603	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CX244522	+	-	+	+	++	+	+++	+	++	+	++	+
CB227550	+	+	na	na	na	+	+	na	na	+	+	+
CB227552	+	+	na	na	na	-	+	na	na	++	++	-
CB227554	-	-	na	na	na	-	+	na	na	+	+	+
CB227556	+	+	na	na	na	+++	-	na	na	+	+	++
CB227557	+	+	na	na	na	+	+	na	na	+++	+++	+
CB227575	+	+	na	na	na	-	+	na	na	+	++	+
CB227571	-	-	na	na	na	-	-	na	na	++	+	+

expression although a small group of transcripts ( $n = 4$ ) were predominantly expressed in the pituitary gland. Assessment of the relative tissue abundance of different transcripts by normalising the data and using EF1- $\alpha$  as the internal control led to the identification of three principal groups of ESTs; i) those with a constant ubiquitous expression (Table 3); ii) those with a low ubiquitous expression (Table 3); and iii) those which were differentially expressed in tissue (Table 3). None of the unidentified ESTs were expressed exclusively in the pituitary gland, although several appeared to be highly expressed in the pituitary in relation to their expression in other tissue (Table 3). One EST was expressed predominantly in the *Sparus auratus* pituitary gland and skin (DN048404), a further EST was expressed predominantly in pituitary gland, brain, gonads and skin (CX244530) and two ESTs were expressed predominantly in the pituitary, brain and gonads (CX244488; CX244500). Currently further work is being carried out to characterise these clones in *Sparus auratus* and to identify homologues in fish in which the full genome has been sequenced (*Fugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis* and *Danio rerio*).

## DISCUSSION

Hormone encoding genes were actively expressed in pituitaries from 3-year-old *Sparus auratus*, as illustrated by their frequent occurrence in the macroarray and the ease with which they were isolated. The abundance of cDNA clones for pituitary hormones is unsurprising and has previously been observed in expression profiles of the human pituitary gland (Hishiki *et al.*, 2000) and in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) pituitary (Karsi *et al.*, 1998). In addition to cDNA for most of the pituitary hormones a range of other ESTs involved in pituitary hormone regulation and synthesis were isolated and included ESTs encoding factors involved in vesicular transport (ARFs, ADP-ribosylation factor); the pituitary-restricted POU domain transcription factor GHF-1/Pit-1, which is required for the expression of GH, PRL and TSH (Theill and Karin, 1993; Andersen and Rosenfeld, 1994) and several other transcription factors.

The tissue distribution of unidentified ESTs was established by RT-PCR using multi-tissue cDNA analysis and revealed that several were most abundant in the pituitary gland. The effectiveness of the approach utilised is clear, as it was possible to exclude 60% of macroarray clones by screening with specific probes and of the 184 non-hormone clones sequenced, five proved to be novel ESTs highly expressed in the

*Sparus auratus* pituitary gland relative to other tissue. Further work is underway to characterise the novel pituitary ESTs and establish their function.

## CONCLUSION

The ESTs arising from the present study and deposited in Genebank represent a useful resource for future studies of *Sparus auratus* and other Sparidae important for southern European aquaculture. The data have been deposited in a database of molecular resources for *Sparus auratus* generated by the European project Bridge-Map ([www.bridgemap.tuc.gr](http://www.bridgemap.tuc.gr)). Moreover, the approach presented is a relatively cheap and quick way to generate type I markers for prospective aquaculture species in which few resources are available.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Teresa Santos and Sara Almeida for technical assistance. This research was funded by the Commission of the European Union, Quality of Life and Management of Living Resources specific RTD programme (Bridge-Map, Q5RS-2001-01797) and Financiamento Plurianual from Fundação para a Ciência e Tecnologia (Portugal).

## REFERENCES

- Altschul, S.F., Boguski, M.S., Gish, W., Wootton, J.C., 1994. Issues in searching molecular sequence databases. *Nature Genetics*, 6: 119-129.
- Andersen, B., Rosenfeld, M.G., 1994. Pit-1 determines cell-types during development of the anterior-pituitary gland - a model for transcriptional regulation of cell phenotypes in mammalian organogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 29335-29338.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7: 1513-1523.
- Church, G.M., Gilbert, W., 1984. Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 1991-1995.
- Donaldson, E., 1997. The role of Biotechnology in sustainable aquaculture. In: Bardach, J. (Ed.), *Sustainable Aquaculture*. John Wiley and Sons, Inc, New York, pp. 101-126.

- Douglas, S.E., Gallant, J.W., Bullerwell, C.E., Wolff, C., Munholland, J., Reith, M.E., 1999. Winter flounder expressed sequence tags: establishment of an EST database and identification of novel fish genes. *Marine Biotechnology*, 1: 458-464.
- Gelderman H, 1975. Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods Theoretical and Applied Genetics 46, 300-319.
- Grunstein, M., Hogness, D.S., 1975. Colony hybridization - method for isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72: 3961-3965.
- Hishiki, T., Kawamoto, S., Morishita, S., Okubo, K., 2000. BodyMap: a human and mouse gene expression database. *Nucleic Acids Research*, 28: 136-138.
- Karsi, A., Li, P., Dunham, R.A., Liu, Z.J., 1998. Transcriptional activities in the pituitaries of channel catfish before and after induced ovulation by injection of carp pituitary extract as revealed by expressed sequence tag analysis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 21: 121-129.
- Kono, T., Sakai, M., LaPatra, S.E., 2000. Expressed sequence tag analysis of kidney and gill tissues from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with infectious hematopoietic necrosis virus. *Marine Biotechnology*, 2: 493-498.
- Liu, Z.J., Karsi, A., Dunham, R.A., 1999. Development of polymorphic EST markers suitable for genetic linkage mapping of catfish. *Marine Biotechnology*, 1: 437-447.
- Martins, R.P., Leach, R.E., Krawetz, S.A., 2001. Whole-body gene expression by data mining. *Genomics*, 72: 34-42.
- Nowell, M.A., Power, D.M., Guerreiro, P.M., Llewellyn, L., Ramsurn, V., Wigham, T., Sweeney, G.E., 2000. Cloning and expression of an elongation factor-1 alpha in sea bream (*Sparus aurata*) larvae and adult tissue. *Marine Biotechnology*, 2: 173-179.
- Santos, C.R.A., Brinca, L., Ingleton, P.M., Power, D.M., 1999. Cloning, expression, and tissue localisation of prolactin in adult sea bream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology*, 114: 57-66.
- Savan, R., Sakai, M., 2002. Analysis of expressed sequence tags (EST) obtained from common carp, *Cyprinus carpio* L., head kidney cells after stimulation by two mitogens, lipopolysaccharide and concanavalin-A. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 131: 71-82.
- Theill, L.E., Karin, M., 1993. Transcriptional control of GH expression and anterior-pituitary development. *Endocrine Reviews*, 14: 670-689.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F, Jeanmougin, F, Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882
- Van Laere AS, Nguyen M, Braunschweig M, Nezer C, Collette C, Moreau L, Archibald AL, Haley CS, Buys N, Tally M, Andersson G, Georges M, Andersson L., 2003. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, 425:832-836.

## EFFECTS OF THE EXCLUSION OF SMALL HERDS FROM THE GENETIC EVALUATIONS OF DAIRY CATTLE IN PORTUGAL

J. VASCONCELOS<sup>1,2</sup>, A. MARTINS<sup>3</sup>, A. FERREIRA<sup>3</sup> e J. CARVALHEIRA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CIBIO-ICETA, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos genéticos - Universidade do Porto. Campus Agrário de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão.

<sup>2</sup>ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

<sup>3</sup>ABLN, Associação para o Apoio à Bovinicultura Leiteira do Norte  
.joanav@mail.icav.up.pt.

(Recepção: 15 de Outubro 2005; Aceitação: 11 de Novembro de 2005)

### ABSTRACT

Small herds may limit the use of herd-test-day as a fixed effect in test-day models due to insufficient number of observations per contemporary group. Some authors recommend the exclusion of those farms but do not discuss the implications that the loss of information may cause to the genetic evaluations. This study simulated 3 data subsets using the National test-day database (**DB**) by gradually eliminating small herds in order to have at least a minimum of 3, 10 and 15 observations per level of fixed effects in the model. The objective was to study trends and the impact of this restriction on some population parameters, such as variance components (**VC**), accuracy of prediction of breeding values (**ACC**) and changes in the genetic rankings of the animals. There was no significant difference ( $p>0.3$ ) between estimated VC, implying that the 3 DB were originated from the same population. On average, there was a negative trend on ACC (0.868, 0.861 and 0.860) according to the level of restriction imposed on the 3 DB (from 3 to 15 observations per contemporary group), implying a diminished opportunity for sires to compete. The correlation between the genetic rankings of the animals was low, especially between sires (from 0.21 to 0.32). Eliminating small herds from the genetic evaluations increased the bias on the prediction of breeding values and was considered a form of preferential treatment of sires. In a relatively small data set like the Portuguese test day DB, the elimination of small herds is not recommended. This emphasizes the need to evaluate other approaches of assembling contemporary groups for test day models.

**Keywords:** Accuracy of prediction, contemporary group, herd-test-day effect, small herds, test day model



## CONSEQUÊNCIAS DA ELIMINAÇÃO DE REBANHOS PEQUENOS DA AVALIAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS LEITEIROS EM PORTUGAL

### RESUMO

A existência de rebanhos com um número insuficiente de observações por grupo contemporâneo põe em causa alguns pressupostos estatísticos dos modelos de contrastes, impondo limites na utilização do rebanho-ano-mês como efeito fixo. Alguns autores optam pela exclusão destes rebanhos sem, no entanto, discutirem as consequências desta perda de informação para as avaliações genéticas. Este estudo utilizou a informação Nacional de contrastes para simular 3 bases de dados (BD), eliminando progressivamente as pequenas explorações (mínimo de 3, 10 ou 15 observações por nível de efeitos fixos no modelo), de modo a evidenciar variações e possíveis tendências nos componentes de variância (CV), rigor de predição (RP) e alterações de ranking dos valores genéticos dos reprodutores. Não houve diferenças significativas ( $p>0,3$ ) entre os CV estimados, assegurando que o processo de amostragem foi aleatório, no sentido de que as 3 BD representam a mesma população. Em média, verificou-se uma tendência decrescente no RP (0,868, 0,861 e 0,860) à medida que aumentou a restrição do número mínimo de observações por nível de efeitos fixos, o que impede alguns reprodutores de competirem em pé de igualdade com os seus pares. As diferenças no ranking genético entre as 3 BD foram muito marcadas, com correlações baixas, especialmente entre touros (de 0,21 a 0,32). Concluiu-se que a exclusão de rebanhos pequenos é uma forma de tratamento preferencial de touros, o que inflaciona o seu valor genético e contribui para o aumento do enviesamento da avaliação genética.

**Palavras chave:** Avaliação genética, efeito rebanho-ano-mês, grupos contemporâneos, modelo de contrastes, rebanhos pequenos

### INTRODUÇÃO

As vantagens dos modelos de contrastes (**MC**) sobre os modelos clássicos de produção acumulada aos 305 dias na avaliação genética dos bovinos leiteiros, estão bem estabelecidas e já não oferecem discussão (Ptak e Schaeffer, 1993; Swalve, 1995; Jamrozik e Schaeffer, 1997; Jamrozik *et al.*, 1997; Wiggans e Goddard, 1997; Carvalheira *et al.*, 1998, 2002a). Existem, porém, alguns constrangimentos identificados nos MC, nomeadamente em relação aos pequenos rebanhos. Se por um lado, a partição dos efeitos ambientais sistemáticos em períodos temporais de curta duração (*e.g.* um mês), conseguem diminuições drásticas nas variâncias ambientais permitindo uma maior expressão da

componente genética, por outro lado, o número de observações em cada grupo contemporâneo (**GC**) torna-se crítico, especialmente em explorações de pequena dimensão. Nestes casos, o número de observações pode ser insuficiente para definir os GC, limitando a possibilidade de utilização do rebanho-ano-mês (**RAM**) como efeito fixo no modelo.

Considerar o RAM como mais um efeito aleatório no modelo seria uma forma de contornar o problema. Esta via foi estudada em detalhe por Schaeffer e Sullivan (1994), apresentando no entanto, algumas desvantagens. A necessidade de estimar mais componentes de variância (**CV**) em modelos que já por si são de grande complexidade, pode tornar o processo demasiado exigente e inviável em termos computacionais. Outros autores apontam para a extrema importância de ajustar os dados para o enviesamento provocado pela utilização não aleatória de touros por exploração (Henderson, 1973; Meyer, 1987; Schaeffer, 1987; Van Vleck, 1987; Visscher e Goddard, 1993), o qual só é possível quando os efeitos sistemáticos ambientais são assumidos como efeitos fixos no modelo.

Há, portanto, vantagens e simplificações importantes em se assumir o efeito dos GC como fixo. Das medidas já propostas, incluem-se técnicas de formação de “clusters”, quer dentro do rebanho (e.g., Schmitz *et al.*, 1991; Carabaño *et al.*, 2004), quer entre rebanhos (e.g., Carvalheira, 2000), ou mesmo uma combinação de ambos os conceitos (e.g., Strabel e Szwaczkowski, 1999). Com o mesmo objectivo, na Alemanha, Swalve (1995) definiu os GC com base no RAM, mas impondo um limite mínimo de observações anuais por exploração (60 lactações por ano), o que garantiria pelo menos 3 contrastes por GC. Esta restrição elimina explorações com reduzido número de observações por GC. A aplicação desta restrição implica a perda de parte da informação, perda esta que pode ser significativa no caso da base de dados portuguesa, cuja percentagem de explorações com número insuficiente de observações por GC, é muito elevada.

Torna-se assim importante, antes de avaliar em detalhe as consequências da aplicação de técnicas de formação de “clusters”, estudar o impacto que a eliminação de pequenos rebanhos terá na avaliação genética Nacional usando o MC. Os objectivos do presente estudo centram-se portanto, na análise da variação de alguns parâmetros genéticos da população Holstein Nacional, de acordo com a aplicação de diferentes critérios para a determinação do tamanho mínimo dos GC.

## MATERIAL E MÉTODOS

A capacidade de particionar os efeitos ambientais sistemáticos em intervalos mensais, permite aos MC tomarem em consideração fontes de variação ambiental que, em outros modelos, contribuem para o enviesamento das avaliações genéticas. Dos vários MC, o auto-regressivo difere dos restantes por assumir que a expressão da produção de leite, ao longo da vida produtiva da fêmea, corresponde a uma única característica quantitativa controlada pelo mesmo grupo de genes.

Este modelo, ao assumir uma única característica e por consequência, um único componente de variância genético, não significa que a heterogeneidade da variância ambiental não seja considerada. Pelo contrário, as diferenças ambientais entre lactações e entre contrastes são tomadas em conta (efeito aleatório do ambiente a longo e curto prazo), resultando em diferentes heritabilidades para cada lactação. Este pressuposto implica que o modelo de análise possua uma estrutura de covariância não genética, onde as medições repetidas são consideradas como variáveis longitudinais representadas como processos auto-regressivos de primeira ordem dentro e entre lactações (Carvalho *et al.*, 1996, 1998, 2002a). O modelo adoptado neste estudo, pode ser descrito da seguinte forma:

$$y_{ijklmn} = RAM_i + Idade(R)_j + DEL(R)_{k(L)} + a_m + p_{m(L)} + t_{n(mL)} + r_{ijklmn},$$

onde,

$y_{ijklmn}$  representa o valor do contraste;

$RAM_i$  mede o efeito fixo do rebanho-ano-mês em que se observou o contraste;

$Idade(R)_j$  mede o efeito fixo hierarquizado por rebanho correspondente à  $j$ ésima classe de idade ao parto;

$DEL(R)_{k(L)}$  mede o efeito fixo devido aos animais testados na mesma classe de dias-em-lactação (DEL) para cada rebanho e lactação (curvas de lactação);

$a_m$  representa o efeito aleatório do animal;

$p_{m(L)}$  representa o efeito aleatório do ambiente a longo prazo, medindo a correlação criada pela vaca ao produzir em mais do que uma lactação, e para o qual se assume um processo auto-regressivo de primeira ordem;

$t_{n(mL)}$  representa o efeito aleatório do ambiente a curto prazo, que mede a correlação entre os contrastes da mesma vaca para cada

lactação e que segue também um processo auto-regressivo de primeira ordem. Assume-se que os contrastes são independentes entre lactações;

$r_{ijkLmn}$  é o termo residual aleatório.

A base de dados (BD) de contrastes do efectivo leiteiro Nacional, com produções entre Junho de 1994 e Dezembro de 2004, foi cedida pela Associação Nacional para o Melhoramento dos Bovinos Leiteiros. A edição dos dados foi baseada nos pressupostos assumidos pelo modelo e descrita detalhadamente em Carvalheira *et al.* (1998) e Vasconcelos *et al.* (2001). Em resumo, da BD inicial conservaram-se apenas as observações pertencentes às primeiras três lactações de cada animal e os contrastes do tipo A4 (manhã e tarde). Foram também eliminadas todas as observações com menos de 5 ou mais de 310 DEL e garantiu-se que todas as fêmeas teriam pelo menos 2 contrastes consecutivos. No final deste processo foram validadas 3.537.305 observações distribuídas por 1.310 explorações, com base na produção de 214.618 vacas, filhas de 12.154 touros.

Para estudar as consequências da eliminação de rebanhos de pequena dimensão, foram comparados parâmetros populacionais obtidos a partir de 3 BD criadas com base nos seguintes critérios: BD3 - onde explorações com menos de 3 observações em pelo menos um nível de efeitos fixos no modelo foram eliminadas (2.956.763 observações distribuídas por 788 explorações, produzidas por 175.487 vacas, filhas de 10.831 touros); BD10 – onde o limite mínimo foram 10 observações por nível de efeitos fixos (1.054.775 observações distribuídas por 147 explorações, produzidas por 62.672 vacas, filhas de 5.521 touros) e; BD15 - contendo apenas explorações com pelo menos 15 observações em todos os níveis de efeitos fixos (290.797 observações distribuídas por 31 explorações, produzidas por 16.784 vacas, filhas de 2.042 touros).

Ao eliminar de forma progressiva as explorações mais pequenas, pretendeu-se evidenciar variações e possíveis tendências nestes parâmetros que permitissem concluir sobre a viabilidade da utilização destas BD truncadas nas avaliações genéticas Nacionais. Os parâmetros avaliados neste estudo incluíram comparações entre CV e autocorrelações, heritabilidade, rigor de predição dos valores genéticos e alterações no ranking genético dos animais presentes. Os CV e autocorrelações foram estimados pelo método DFREML-SIMPLEX (Smith e Graser, 1986) recorrendo a um processo de amostragem aleatória estratificada com 5 réplicas, de modo a garantir a representação de explorações em todas as regiões do País.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro I contém os valores estimados para os CV, autocorrelações e heritabilidade nas 3 BD em estudo. Os valores obtidos neste trabalho são similares aos previamente estimados em Portugal (Carvalho et al., 2002b), usando o mesmo modelo animal e estão dentro dos limites descritos na literatura (Carvalho et al., 2002a; Druet et al., 2005; Melo et al., 2005). Verificou-se uma tendência muito ligeira para o aumento nos CV associada positivamente ao tamanho dos GC que definem as 3 BD. Estas diferenças podem também ser observadas entre os valores de heritabilidade obtidos. A ausência de significância estatística entre estas diferenças ( $p>0,3$ ), valida o processo aleatório de amostragem, no sentido das 3 BD representarem a mesma população. Por este motivo e para efeitos deste trabalho, foi utilizada a média aritmética dos 3 estimadores para o cálculo dos restantes parâmetros analisados.

QUADRO I - COMPONENTES DE VARIÂNCIA ( $\text{kg}^2$ ) E AUTOCORRELAÇÕES PARA A PRODUÇÃO DIÁRIA DE LEITE NO EFECTIVO HOLSTEIN NACIONAL PARA AS PRIMEIRAS 3 LACTAÇÕES ( $L_1$ ,  $L_2$  E  $L_3$ ) NAS 3 BASES DE DADOS (BD3, BD10 E BD15).

Parâmetro	BD3 <sup>a</sup>	BD10	BD15
Variância genética	7,9363	8,2256	8,7843
Variância ambiental	3,7009	3,9786	4,4478
Variância ALP <sup>b</sup>	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Autocorrelação ALP	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Variância ACP <sup>c</sup> ( $L_1$ )	12,5742	13,5512	13,0997
Autocorrelação ACP ( $L_1$ )	0,8412	0,8250	0,8294
Variância ACP ( $L_2$ )	24,7861	25,8795	26,2600
Autocorrelação ACP ( $L_2$ )	0,8327	0,8164	0,8200
Variância ACP ( $L_3$ )	29,3067	30,4231	30,5559
Autocorrelação ACP ( $L_3$ )	0,8241	0,8044	0,8003
Heritabilidade ( $L_1$ )	0,3278	0,3194	0,3336
Heritabilidade ( $L_2$ )	0,2179	0,2160	0,2224

<sup>a</sup>BD3 = 3 ou mais observações por grupo contemporâneo; BD10 = 10 ou mais observações por grupo contemporâneo; BD15 = 15 ou mais observações por grupo contemporâneo. <sup>b</sup>ALP = Efeito Ambiental a Longo Prazo; <sup>c</sup>ACP = Efeito Ambiental a Curto Prazo.

O rigor de predição (RP), definido como a correlação teórica entre os valores genéticos aditivos (VGA) verdadeiros (nunca observados) e os VGA estimados, é um critério fundamental de selecção num programa de melhoramento animal (Pollak e Quaas, 1983). Este parâmetro é função da variância genética aditiva e da variância do erro de predição, a qual depende em grande medida do número de observações que cada animal contribui para a sua avaliação (Henderson 1975; Swalve, 1995). No que diz respeito aos touros, a diminuição do número de explorações entre BD e, por consequência, do número de filhas e respectivas observações, teve um impacto marcado na distribuição das frequências do RP, como se pode observar na Fig. 1. Apesar de serem elevados (médias de 0,868, 0,861 e 0,860 para a BD3, BD10 e BD15, respectivamente), verifica-se que na BD3 os touros apresentam, em média, RP mais altos e a tendência é decrescente à medida que aumenta a restrição do número mínimo de observações por nível de efeitos fixos nas 3 BD. Seria de esperar que, quanto maior fosse o número de contemporâneos em cada grupo, menor a variância do erro de predição e, portanto, maior o RP. No entanto, verificou-se que o peso da contribuição colectiva do número total de filhas (que diminui com a eliminação de explorações) foi determinante para a magnitude deste parâmetro, pois, tal como Tosh e Wilton (1994) referem, o número total de observações tem uma elevada correlação com o RP. A eliminação de explorações de dimensão menor poderá portanto ter, consequências negativas no melhoramento genético, que neste caso se traduzem na perda de oportunidade de selecção de alguns reprodutores.

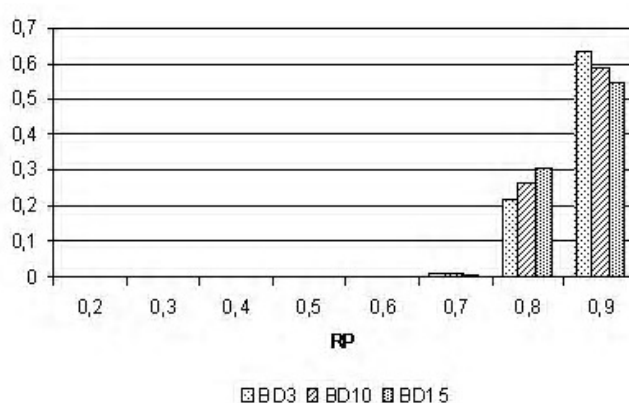


Figura 1. Frequência de valores do rigor de predição (RP) estimados em machos com 15 ou mais descendentes, em pelo menos 5 explorações, nas 3 bases de dados em estudo (BD3, BD10 e BD15 com 3, 10 e 15 ou mais observações por grupo contemporâneo, respectivamente).

Por outro lado, eliminar os rebanhos mais pequenos pode ser também uma forma de tratamento preferencial no que diz respeito à selecção de reprodutores machos. De uma maneira geral, as explorações maiores investem mais na genética (Henderson, 1973; Schaeffer, 1991), sendo de esperar que o progresso genético anual nestes rebanhos seja proporcionalmente maior do que nos mais pequenos. Este aspecto está reflectido nos gráficos apresentados na Fig. 2. Enquanto o progresso genético nas fêmeas foi praticamente igual nas 3 BD, o mesmo não se verificou nos machos, onde o impacto desta forma de tratamento preferencial foi bastante acentuado (Fig. 2). O caso extremo é representado pelo progresso genético anual dos machos com 10 e mais filhas, onde a diferença observada entre a BD3 e a BD15 (1996 a 1998, inclusive), é de 141 kg anuais de leite por lactação (Quadro II). Esta diferença reflecte a eliminação selectiva de filhas provenientes de explorações que em média são geneticamente inferiores e que, na sua maioria, correspondem às explorações mais pequenas. A principal consequência desta forma de tratamento preferencial de touros é um incremento artificial do seu valor genético, que potencialmente pode contribuir para a inflação dos custos da componente reprodução.

QUADRO II- COEFICIENTES DE REGRESSÃO (KG/ANO) DO PROGRESSO GENÉTICO PARA A PRODUÇÃO ACUMULADA DE LEITE AOS 305 DIAS EM MACHOS NASCIDOS ENTRE 1996 E 1998 (INCLUSIVE), NAS 3 BASES DE DADOS EM ESTUDO.

	BD3 <sup>a</sup>	BD10	BD15
M3 <sup>b</sup>	101,14	86,91	92,15
M5	79,65	110,94	171,18
M10	91,19	105,83	231,93

<sup>a</sup>BD3 = 3 ou mais observações por grupo contemporâneo; BD10 = 10 ou mais observações por grupo contemporâneo; BD15 = 15 ou mais observações por grupo contemporâneo. <sup>b</sup>M3, M5 e M10 = machos com pelo menos 3, 5 e 10 filhas respectivamente).

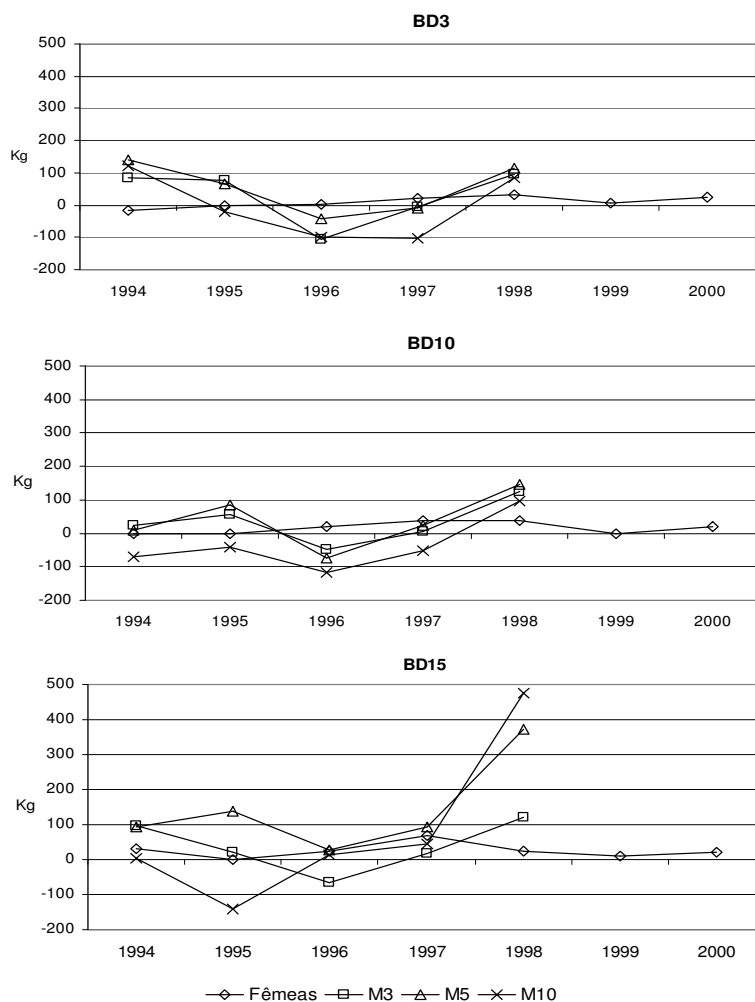


Figura 2. Progresso genético anual do efectivo Nacional Holstein para a produção acumulada de leite aos 305 dias, nas 3 bases de dados em estudo (**BD3**, **BD10** e **BD15** com 3, 10 e 15 ou mais observações por grupo contemporâneo, respectivamente; **M3**, **M5** e **M10** = machos com pelo menos 3, 5 e 10 filhas respectivamente).

O RP é um indicador do nível de confiança estatística dos VGA estimados e, é com base nestes últimos que, em termos práticos, se identificam os animais geneticamente superiores e se decide sobre a sua eventual selecção como reprodutores. Em características limitadas ao sexo, a avaliação (neste caso, dos machos) é indirecta e depende maioritariamente do seu número de filhas e em



quantas explorações elas são contrastadas (Pollak e Quaas, 1983). À partida, é portanto de esperar que a exclusão de rebanhos, mesmo que de pequenas dimensões, venha a alterar o ranking dos VGA dos animais avaliados, com especial ênfase nos machos. O impacto destas alterações na economia das explorações e no progresso genético da população, pode ser de extrema importância, pois é um dos factores que determinam a competitividade entre touros e consequentemente, influencia de forma dramática a indústria produtora de sémen seleccionado. Relativamente à BD3, a percentagem dos animais “top 100” em comum com a BD10 foi de 21% em machos e de 35% em fêmeas. Comparando com a BD15, essa percentagem baixou consideravelmente, ficando apenas com 7% de machos e 17% de fêmeas em comum com a BD3. O Quadro III dá uma indicação deste reordenamento, mostrando a “negrito” os animais em comum nas 3 BD, para os primeiros 10 animais de cada sexo. As correlações de ranking entre os VGA obtidos com base na avaliação das 3 BD (Quadro IV) confirmam estas alterações e mostram que elas são mais marcadas nos machos do que nas fêmeas. Com correlações de ranking tão baixas (como 0,21), torna-se claro que a exclusão de rebanhos deve ser limitada ao mínimo e o tamanho dos GC deve ser garantido recorrendo a outros procedimentos (e.g., técnicas de agrupamento). Esta conclusão é partilhada por vários autores (Schmitz *et al.*, 1991; Strabel e Szwaczkowski, 1999; Carvalheira, 2000; Carabaño *et al.*, 2004) ficando, no entanto, por definir a melhor metodologia de modo a simultaneamente, minimizar o enviesamento dos VGA e maximizar o RP.

QUADRO III - LISTA DOS GENETICAMENTE 10 MELHORES ANIMAIS NAS 3 BASES DE DADOS EM ESTUDO.

Ranking	Machos			Fêmeas		
	BD3 <sup>a</sup>	BD10	BD15	BD3	BD10	BD15
1	<b>875531<sup>b</sup></b>	616143	169117	832024	872987	<b>501393</b>
2	26676	<b>709711</b>	309137	782647	783242	596715
3	<b>709711</b>	364910	1022843	526378	834592	834592
4	633788	<b>875531</b>	216819	<b>565022</b>	<b>501393</b>	773560
5	200133	111330	364291	<b>653428</b>	<b>565022</b>	856449
6	713843	530611	155730	804910	<b>653428</b>	832024
7	227807	215927	388763	477853	1067455	597146
8	878655	620028	531645	<b>501393</b>	570613	475229
9	<b>67548</b>	<b>67548</b>	713687	866800	969399	373476
10	1085933	146361	77111	703292	490978	792701

<sup>a</sup>BD3 = 3 ou mais observações por grupo contemporâneo; BD10 = 10 ou mais observações por grupo contemporâneo; BD15 = 15 ou mais observações por grupo contemporâneo. <sup>b</sup>animais em “negrito” são comuns entre bases de dados.

QUADRO IV - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ENTRE O RANKING GENÉTICO PARA MACHOS (ACIMA DA DIAGONAL) E FÊMEAS (POR BAIXO DA DIAGONAL), NAS 3 BASES DE DADOS EM ESTUDO.

	BD3 <sup>a</sup>	BD10	BD15
BD3	--	0,32	0,21
BD10	0,83	--	0,28
BD15	0,82	0,83	--

<sup>a</sup>**BD3** = 3 ou mais observações por grupo contemporâneo; **BD10** = 10 ou mais observações por grupo contemporâneo; **BD15** = 15 ou mais observações por grupo contemporâneo.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo comprovam que a exclusão de rebanhos de pequena dimensão da avaliação genética pode ter consequências dramáticas na selecção de reprodutores, influenciando negativamente o progresso genético da população. Se, por um lado, é necessário garantir um número mínimo de observações em cada GC, por outro lado há que maximizar o número de filhas e de rebanhos que contribuem para a avaliação dos touros. Agrupar rebanhos pode ser uma solução para este problema, mas torna-se necessário encontrar e desenvolver técnicas que definam quais os critérios de semelhança a serem usados entre eles, de modo a minimizar outras fontes de enviesamento à avaliação genética.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela FCT, através da bolsa SFRH/BD/11397/2002.

## BIBLIOGRAFIA

- CARABAÑO, M.J., MORENO, A., LÓPEZ-ROMERO, P. e DIAZ, C., 2004. Comparing alternative definitions of the contemporary group effect in Avileña Negra Ibérica beef cattle using classical and Bayesian criteria. *J. Anim. Sci.*, 82:3447-2457.
- CARVALHEIRA, J., 1996. Development and application of an autoregressive process for estimating genetic parameters of daily milk yield in a herd of tropical Lucerna cattle and in US Holstein herds. Doctoral Dissertation, Cornell Univ., Ithaca, NY, pp.200.

- CARVALHEIRA, J., 2000. Predição de parâmetros genéticos para a produção diária de leite em gado Holstein, Pardo Suíço e Modicana no sudeste Siciliano. X Congresso de Zootecnia, p.103.
- CARVALHEIRA J., BLAKE, R.W., POLLAK, E.J., QUAAS, R.L. e DURAN-CASTRO, C.V., 1998. Application of an autoregressive process to estimate genetic parameters and breeding values for daily milk yield in a tropical herd of Lucerna cattle and in US Holstein herds. J. Dairy Sci., 81:2738-2751.
- CARVALHEIRA J., POLLAK, E.J., QUAAS, R.L. e BLAKE, R.W., 2002a. An autoregressive repeatability animal model for test-day records in multiple lactations. J. Dairy Sci., 85:2040-2045.
- CARVALHEIRA, J., VASCONCELOS, J., MARTINS, A., PETIM-BATISTA, M.F., SILVESTRE, A., FERREIRA, A. e COLAÇO, J., 2002b. Parâmetros e Tendências Genéticas para Produção Diária de Leite, Gordura e Proteína do Efectivo Nacional Holstein Usando um Modelo de Contrastes Auto-regressivo. XII Congresso de Zootecnia, pp.531- 537.
- DRUET, T., JAFFREZIC, F. e DUCROCQ, V., 2005. Estimation of genetic parameters for test day records of dairy traits in the first three lactations. Genet. Sele. Evol., 37(3):257-271.
- HENDERSON, C.R., 1973. Sire evaluation and genetic trends. In: Proc. Anim. Breeding Genet. Symp. In Honor of Dr. J. L. Lush, Am. Soc. Anim. Sci., Am. Dairy Sci. Assoc., Champaign, IL, p.10.
- HENDERSON, C.R., 1975. Comparison of alternative sire evaluation methods. J. Anim. Sci., 41:760-770.
- JAMROZIK, J. e SCHAEFFER, L.R., 1997. Estimates of Genetic Parameters for a Test Day Model with Random Regressions for Yield Traits of First Lactation Holsteins. J. Dairy Sci., 80:762-770.
- JAMROZIK, J., SCHAEFFER, L.R. e DEKKERS, J.C.M., 1997. Genetic Evaluation of Dairy Cattle Using Test Day Yields and Random Regression Model. J. Dairy Sci., 80:1217-1226.
- MELO C.M.R., PACKER, I.U., COSTA, C.N. e MACHADO, P.F., 2005. Genetic parameters for test day and lactation milk yields of first lactation Holstein cows. Rev. Bras. Zoot., 34(3):796-806.
- MEYER, K., 1987. Estimates of variance due to sire x herd interactions and environmental covariances between paternal half-sibs for first lactation dairy production. Livest. Prod. Sci., 17:95-115.
- PTAK, E. e SCHAEFFER, L.R., 1993. Use of test day yields for genetic evaluation of dairy sires and cows. Livest. Prod. Sci., 34: 23-34.
- POLLAK, E.J., e QUAAS, R.L., 1983. Definition of group effects in sire evaluation models. J. Dairy Sci. 66(7):1503-1509.
- SCHAEFFER, L., 1987. Estimation of variance components under a selection model. J. Dairy Sci., 70: 661-671.
- SCHAEFFER, L., 1991. C.R. Henderson: Contributions to predicting genetic merit. J. Dairy Sci., 74: 4052-4066.
- SCHAEFFER, L. e SULLIVAN, B., 1994. Genetic evaluation of dairy goats using test day yields. Proc. 5th World Cong. Gen. Appl. Livest. Prod., 18:182-185.
- SCHMITZ, F., EVERETT, R.W. e QUAAS, R.L., 1991. Herd-year-season clustering. J. Dairy Sci., 74: 629-636.

- SMITH, S.P. e GRASER, H.U., 1986. Estimating variance components in a class of mixed models by restricted maximum likelihood. *J. Dairy Sci.*, 69: 1156-1165.
- STRABEL, T. e SZWACZKOWSKI, T., 1999. The use of test day models with small size of contemporary groups. *J. Anim. Breed. Genet.*, 116: 379-386.
- SWALVE, H.H., 1995. The effect of test day models on the estimation of genetic parameters and breeding values for dairy yield traits. *J. Dairy Sci.*, 78: 929-938.
- TOSH, J.J. e WILTON, J.W., 1994. Effects of data structure on variance of prediction error and accuracy of genetic evaluation. *J. Dairy Sci.*, 72: 2568-2577.
- VAN VLECK, L., 1987. Contemporary groups for genetic evaluations. *J. Dairy Sci.*, 70: 2456-2464.
- VASCONCELOS, J., PETIM-BATISTA, M.F., SILVESTRE, A., FERREIRA, A., MARTINS, A., COLAÇO, J. e CARVALHEIRA, J., 2001. Predição de lactações padronizadas aos 305 dias, de leite, gordura e proteína do efectivo leiteiro Nacional, usando um modelo de contrastes autoregressivo. XI Congresso de Zootecnia, pp.105-106.
- VISSCHER, P.M. e GODDARD, M.E., 1993. Fixed and random contemporary groups. *J. Dairy Sci.*, 76:1444-1454.
- WADE, K.M., 1990. Parameter estimation for mixed linear models with first order autoregressive covariance structure. Doctoral Diss., Cornell Univ. Ithaca, NY, p.117.
- WIGGANS, G.R. e GODDARD, M.E., 1997. A Computationally Feasible Test Day Model for Genetic Evaluation of Yield Traits in the United States. *J. Dairy Sci.*, 80:1795-1800.