

## Índice

<i>E.R.B. Batista e J.G.F. Batista</i>	1
<b>INDICADORES ENERGÉTICOS DE SUSTENTABILIDADE AGRÍCOLA – UMA AVALIAÇÃO AO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE LEITE NA ILHA TERCEIRA (AÇORES)-----</b>	<b>1</b>
<i>A.A. Marta-Costa e A. Dinis Poeta</i>	16
<b>VALORIZAÇÃO DE ZONAS DE MONTANHA ATRAVÉS DA EXPLORAÇÃO DE GADO BOVINO -----</b>	<b>16</b>
<i>M.R. Faria, R. Metelo, P. Santos, A. Chaveiro e F. Moreira da Silva*</i>	32
<b>Capacidade de sobrevivência de hemi-embriões bovinos após congelamento/descongelamento-----</b>	<b>32</b>
<i>I. Almeida<sup>1</sup>, E. Torrado<sup>2</sup>, M.F. Marques<sup>2</sup> e H. M. Martins<sup>2</sup></i>	43
<b>CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOTA DE MILHO EM GRÃO-----</b>	<b>43</b>



## ENERGY INDICATORS OF AGRICULTURAL SUSTAINABILITY – A SURVEY OF DAIRY FARMING AT TERCEIRA ISLAND (AZORES)

**E.R.B. BATISTA e J.G.F. BATISTA**

*University of the Azores, Department of Agricultural Sciences, Centro de Investigação em Tecnologias Agrárias (CITA-A), 9701-851 Angra do Heroísmo, Azores – Portugal.  
Correspondence author (jbatista@mail.angra.uac.pt)*

*(Recepção: 8 de Março de 2007; Aprovação: 8 de Junho de 2007)*

### ABSTRACT

Efficient energy use by agriculture is one of the conditions for sustainable agriculture. For this reason, energy use in conventional milk production at Terceira Island (Azores) was studied. A survey of ten dairy farms, including data from a five-year period, was conducted. Direct inputs consisted on fuel, lubricants and electricity. Indirect energy input to the farms included feedstuffs, fertilizers, agrochemicals, seeds and other substantial purchases. Capital plant, equipments and improvements accounted for capital inputs. On an annual basis, for a stocking density of 1.8 cows ha<sup>-1</sup>, the average farm used 31.3 GJ ha<sup>-1</sup>. Direct energy represented 16.3% of the total energy intensity, indirect energy 74,9 % and capital energy 8.8%. The calculated overall energy ratio was 3.8 and the protein energy ratio 0.6. The gross CO<sub>2</sub> emission intensity was 14.7 tons CO<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup>. For an average utilized area of 19.2 ha, the average feedstuff was 1906 kg ha<sup>-1</sup>, average nitrogen application rate 139.5 kg N ha<sup>-1</sup> and fuel used 297.5 litres ha<sup>-1</sup>. These inputs resulted in an average milk production of 5405 litres cow<sup>-1</sup>, for an average price of about 0.08 € litre<sup>-1</sup>. Despite an apparent good economic result, in terms of energy utilization, the surveyed farms are not efficient, not sustainable in a future perspective, limiting the competitive capacity.

**Keywords:** Azores, energy use, input-output, milk, sustainability

## INDICADORES ENERGÉTICOS DE SUSTENTABILIDADE AGRÍCOLA – UMA AVALIAÇÃO AO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE LEITE NA ILHA TERCEIRA (AÇORES)

### RESUMO

A utilização eficiente de energia em agricultura, constitui uma das condições para a sua sustentabilidade. Foi por esta razão que se estudou o modo de utilização de energia na produção convencional de leite na Ilha Terceira, Açores. Avaliaram-se dez explorações leiteiras, utilizando dados referentes a um período de 5 anos. Consideraram-se como entradas directas de energia o combustível, os lubrificantes e a electricidade. Como entradas indirectas

de energia para as explorações, consideraram-se as rações, os adubos, os pesticidas, os herbicidas, as sementes e outras aquisições pontualmente necessárias. Como entradas de capital, consideraram-se as construções, os equipamentos e as melhorias realizadas nas explorações. Para uma densidade de 1,8 vacas ha<sup>-1</sup>, as explorações avaliadas utilizaram em média e por ano, 31,3 GJ ha<sup>-1</sup>. A energia directa representou 16,3% da intensidade total de energia, a indirecta 74,9 % e a de capital 8,8%. O rácio total de energia (entradas / saídas), foi de 3,8 e o rácio de energia proteica igualou 0,6. A intensidade de emissão bruta de CO<sub>2</sub>, foi de 14,7 ton ha<sup>-1</sup>. Para um valor médio de área explorada de 19,2 ha, utilizaram-se em média, 1906 kg ha<sup>-1</sup> de rações, 139,5 kg ha<sup>-1</sup> de azoto e 297,5 L ha<sup>-1</sup> de combustíveis. Estas entradas resultaram numa produção média de leite de 5405 L vaca<sup>-1</sup>, a um custo médio de cerca de 0,08 € L<sup>-1</sup>. Apesar de, aparentemente, o resultado económico ter sido bom, em termos de utilização de energia, as explorações avaliadas revelaram-se ineficientes, não sustentáveis em termos da sua futura capacidade competitiva.

**Palavras-chave:** Açores, entradas – saídas, leite, sustentabilidade, utilização de energia

## INTRODUCTION

Agriculture is a primary activity by which human societies channel contemporary renewable energy flows into products that support welfare (Rydberg and Haden, 2006). Over the past century, agricultural systems, agricultural technology and the socioeconomic structures they are coupled with, have undergone a dramatic transformation and this transformation has been especially pronounced in the industrialized and newly industrializing regions of the world (Cleveland, 1994; Conforti and Giampietro, 1997; Björklund *et al.*, 1999). Among the observed trends, there was an impressive increase in commercial energy use in agriculture production and a non-less dramatic decrease in direct labour requirements, as well as a substantial increase in gross productivity per unit labour and per unit area.

At the Rio Earth Summit in 1992, a new management approach was acknowledged as “eco-efficiency”. Basically, eco-efficiency means to add maximum value with minimum use of resources and with minimum environmental impact (WBCSD, 2000; Jollands *et al.*, 2004).

Efficient energy use by the agricultural sector is therefore one of the conditions for sustainable agriculture, because it allows financial savings, fossil resources preservation and air pollution decrease. Indicators based on energy consumption together with other indicators for land, water use, social effects and financial performance, may be important for farmers and policy advisers, in order to assess the overall sustainability of agricultural activities, to ensure the competitiveness of the end products, as well as to provide policy-makers and planners with the right tools to assess the best use of land in the future. The nine islands of the archipelago of the Azores extend for more than 600 km, and lie in a northwest-southeast

direction, latitude 37° 44' N. The population is around 241 000 inhabitants (SREA, 2006) for a total area of 2333 km<sup>2</sup>.

There are approximately 18 000 agricultural farms, which are almost entirely family-worked. The farming population still makes about one third of the total working population, with a tendency for declining. Agriculture and forestry account for about 33% of jobs and 20% of the regional added value (DREPA, 2006). The region's handicaps are caused in particular from its island status and the distances between islands.

Among the difficulties facing the agriculture productivity are the small or very small sizes of 84% of holdings, excessively high production costs, transport and supply problems, inadequate processing and marketing infrastructure as well as a heavy dependency from external direct or indirect energy inputs. Rocky land and high rainfall may sometimes result in environmental damage and require permanent plant cover to be maintained in areas at risk, while in some islands agriculture is provoking the eutrophication of lake water.

Among the region's strengths are its mild Atlantic climate and volcanic soils, which make agriculture very productive up to 300 m altitude, while the land is well suited for grazing above that altitude.

According to the last census (SREA, 2006), the dairy farm sector is represented by 4274 farms. At Terceira Island (402 km<sup>2</sup>) there are 876 dairy farms with an average area of about 10-11 ha, for a total population of 21740 milking cows, representing a total of 1.23 x 10<sup>8</sup> litres year<sup>-1</sup> (Terceira Farmers Association, personal communication).

The aim of this study was to determine baseline data on total energy inputs as sustainable indicators of dairy farm production at Terceira Island.

## **MATERIAL AND METHODS**

The work was first conducted in order to develop indicators of agricultural sustainability based on a set of energy indicators, for a future possibility to produce tools for farmers and policy advisers to assess the overall sustainability of agricultural activities, to ensure the competitiveness of local products and to provide policy-makers necessary means to assure the best use of land in the future. Data on farm production, direct farm energy use, indirect inputs such as fertilizers, agrochemicals, purchased feedstuff and seeds, and capital inputs associated with buildings and machinery, were collected from 10 farms in collaboration

---

with Terceira Island Farmers Association, for the period between 1998 and 2002. This was assumed as a first step for further analysis, surveying more farms.

In our study, we used process analysis (Fluck, 1992), evaluating both direct energy inputs and all indirect energy inputs. Human labour and solar energy were not considered. Indirect energy was only used one-step backwards from the farm. According to Refgaard *et al.* (1998), in general the last two stages of a production process will cover more than 90% of the total fossil energy input.

Total energy input was expressed in GJ. It was calculated as the sum of all direct and indirect energy inputs for each farm. Direct energy input was composed by the energy used on each farm for field and livestock operations. It included the amount of fuel (L), lubricants (kg) and electricity (kWh), on an annual basis. The calculated energy was the caloric energy content and the energy used for mining, transformation and transport of the energy carrier. Indirect energy input to the farm included the energy needed for production and transportation of mineral fertilizers (by fertilizer type or nutrient quantity), agrochemicals, seeds, feedstuffs bought-in from outside the farm and any other substantial purchases. Capital energy input included capital plant, equipments and improvements. To determine an effective annual energy requirement, the total embodied energy of each item was discounted over an assumed life, using straight-line depreciation.

For each farm, milk production expressed as kg of milk solids was calculated annually. Milk was considered the main output from dairy farms. The calorific content for milk was considered to be  $3.11 \text{ MJ kg}^{-1}$ , with a milk solids content of  $125 \text{ g kg}^{-1}$ .

The total primary energy use and carbon dioxide emissions associated with each input were calculated using energy coefficients and carbon dioxide emission factors derived from international data, in accordance with revised 1996 IPCC Guidelines (IPCC, 1997).

### **Relationships between input factors, coefficients and indicators**

The total energy indicators for the on-farm level were the energy input per mass (or volume) of production, representing a baseline comparison of total energy requirement; the energy input per area of productive land, representing a baseline indicator of energy intensity; the percentage of direct, indirect and capital inputs, as possible indicators of sustainability; the percentage of renewable energy input; the quotient of total energy input per total energy output, as a measure of energy conversion efficiency to food; the ratio of total energy input per protein energy output, as a measure of energy conversion efficiency to protein; the gross

CO<sub>2</sub> emission rate and the gross CO<sub>2</sub> emission intensity, as simple measures of environmental effect.

In addition, also some other important production indicators were used, such as the quotient of annual milk solids production per cow in milk, as indicator of the mean productivity of animals; the number of cows in milk per effective milking area, as indicator of the intensity of utilization of land area; and the annual milk solids production per effective milking area as indicator of land area productivity.

The energy balance started with the calculation of total energy input (E), which represents the sum of the level of a number of independent input factors (Fi) multiplied by appropriate energy coefficients for that factor (Bi).

$$E = \sum (B_i F_i)$$

The gross CO<sub>2</sub> emission (G) was found by multiplying the individual components of the primary energy input by an appropriate CO<sub>2</sub> emission factor (Ci) and summing.

$$G = \sum (C_i B_i F_i)$$

Other factors required to calculate the indicators are: the annual milk solids production (M), the effective production area (A) and the number of cows in milk (N). The average production per cow ( $m_c$ ) and the stocking rate (n) can be determined from these factors.

$$m_c = M / N$$

$$n = N / A$$

The production intensity (m), energy intensity (e) and gross emission intensity (g) are effectively intermediate variables or indicators that are determined by the total milk solids production, total primary energy input, gross CO<sub>2</sub> emissions and effective milking area.

$$m = M / A = N \cdot m_c$$

$$e = E / A$$

$$g = G / A$$

---

The gross carbon dioxide emission per kilogram of milk solids ( $g_p$ ) was determined by dividing the gross emission intensity by the production intensity. It is a simple measure of environmental effect.

$$g_p = G / M = g / m$$

The energy output intensity ( $e_o$ ) can be calculated from the production intensity multiplied by the calorific energy coefficient of milk ( $B_M$ ).

$$e_o = B_M m$$

The primary energy requirement per unit of milk solids production ( $e_p$ ) was determined by the ratio of energy intensity to the production intensity.

$$e_p = e / m = E / M$$

The overall energy ratio (OER) represents the quotient between the input energy intensity to the output energy intensity. It is a measure of energy conversion efficiency to food.

$$OER = \frac{e}{e_o} = \frac{E}{E_o}$$

The protein energy ratio (PER) was found by multiplying the OER by the protein fraction, which was assumed to be constant.

$$PER = P \times OER$$

Surveyed data entered a general table, checked manually to avoid errors. From this table several spreadsheets were build and linked. The spreadsheets contained all the necessary coefficients to calculate the total energy inputs, outputs and energy indicators for each farm surveyed.

## RESULTS

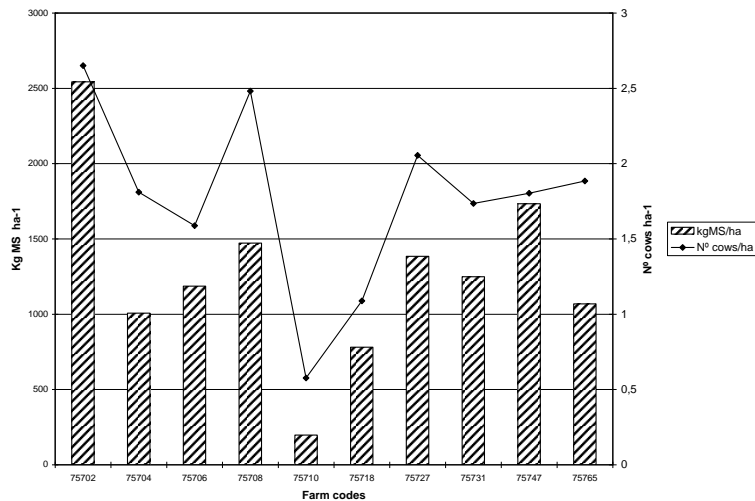
### Energy indicators

Fig. 1 represents some raw indicators of the ten surveyed farms, namely the land utilization intensity (cows  $ha^{-1}$ ) and production intensity (kg milk solids  $ha^{-1}$ ). Information about farm altitude is also provided. Milk production in terms of litres cow year<sup>-1</sup> was 5405.3

---



$\pm 1011.9$  (range between 2663.5 and 7463.4) and in terms of  $L\ ha^{-1}$ , was  $9981.8 \pm 3391.8$  (range between 1535 and 19752.9). Overall, the surveyed farms can be classified as intensive farming systems.



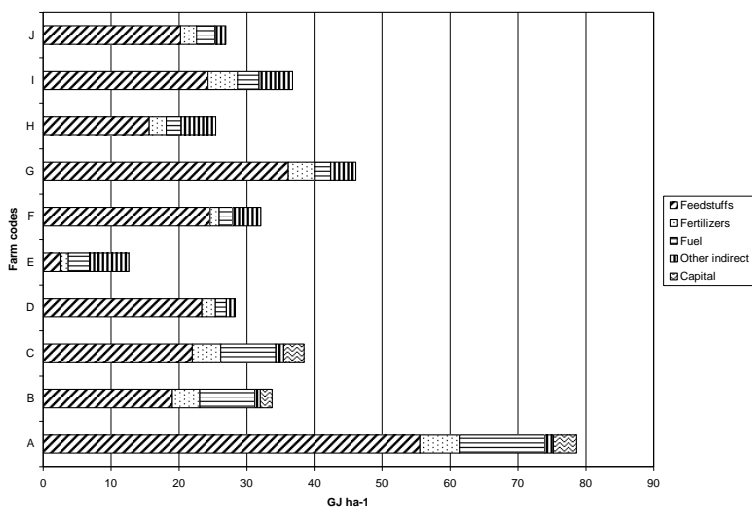
The energy indicators for the surveyed farms are shown in Table I. The total energy inputs ranged from 1860 to 9360 GJ. The average farm used 4600 GJ of energy, made up of 1000 GJ of direct energy purchases (fuel and electricity), 3300 GJ of indirect purchases (feedstuffs, fertilizers, agrochemicals, seeds, etc.) and 300 GJ of capital energy purchases (tractors, trucks, machinery and buildings).

TABLE I - AVERAGE ENERGY INDICATORS FOR SURVEYED FARMS.

Total Energy Indicator	Mean value $\pm$ 95 % Confidence Interval	Range
Total Energy Intensity (GJ ha <sup>-1</sup> )	31.3 $\pm$ 7.3	12.7 – 46.1
Total Energy Input per Unit Production (MJ kg <sup>-1</sup> MS)	30.7 $\pm$ 5.1	22.1 – 39.4
Direct Energy (%)	16.3 $\pm$ 4.2	7.4 – 25.7
Indirect Energy (%)	74.9 $\pm$ 7.5	50.8 – 87.6
Capital Energy (%)	8.8 $\pm$ 4.6	2.2 – 25.5
Overall Energy Ratio (MJ in/MJ out)	3.8 $\pm$ 0.6	2.8 – 4.9
Protein Energy Ratio (MJ in/MJ protein)	0.6 $\pm$ 0.1	0.5 – 0.8
Gross CO <sub>2</sub> Emission Ratio (kg CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS)	2.4 $\pm$ 1.8	0.2 – 9.1
Gross Emission Intensity (tons CO <sub>2</sub> ha <sup>-1</sup> )	14.7 $\pm$ 11	4.1 – 56.7
Average animal productivity (kg MS ha <sup>-1</sup> )	1119.7 $\pm$ 340.7	197.6 – 1733
Stocking density (cows ha <sup>-1</sup> )	1.8 $\pm$ 0.4	0.6 – 2.7
Land Productivity (kg MS cows <sup>-1</sup> )	690 $\pm$ 131	342.9 – 960.9
Renewable Energy (%)	0	

When combined with the production indicators, the average dairy farm was found to have a total energy use of  $31.3 \pm 7.3$  GJ per effective milking area or  $30.7 \pm 5.1$  MJ per kg of

milk solids (MS) production. The range of total energy intensity was 12.7 to 46.1 GJ ha<sup>-1</sup> (Fig. 2) or 22.1 to 39.4 MJ kg MS<sup>-1</sup> (Fig. 3).



In 1998-2002, 16.3 ± 4.2 percent of the total energy input of the farms could be attributed to direct energy use, 79.4 ± 7.5 percent to indirect energy use and 8.8 ± 4.6 percent to capital energy inputs. The make up of energy inputs varied considerably between farms.

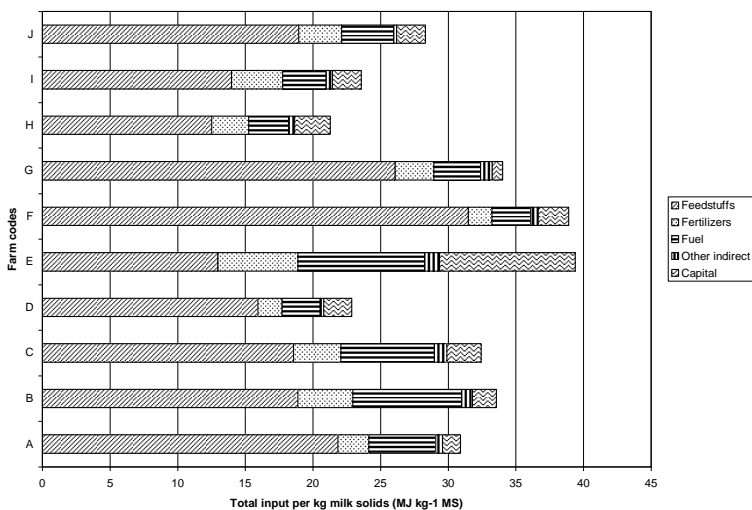


Figure 3 – FALTA O TEXTO

Based on effective area, direct energy inputs was 5.9 GJ ha<sup>-1</sup>, with a range of 1.8 to 13.0 GJ ha<sup>-1</sup>. Indirect energy inputs was 292 GJ ha<sup>-1</sup> and ranged from 4.0 to 62.7 GJ ha<sup>-1</sup>. Capital inputs were less variable (1.0 to 3.7 GJ ha<sup>-1</sup>), with a mean value of 2.6 GJ ha<sup>-1</sup>.

Total energy output per farm varied between 40 and 400 GJ with the mean of  $190 \pm 80$  GJ. This corresponds to an average output of  $10.3 \text{ MJ ha}^{-1}$ . The mean value of the overall energy ratio (OER) was  $3.8 \pm 0.6$ , which means that 380 MJ of total energy input was required to produce 100 MJ of food energy as milk. Since milk was the only output, there was a linear relationship between OER and energy requirement per kg of milk solids, which mean that an OER of 1 corresponds to  $7 \text{ MJ kg}^{-1} \text{ MS}$ .

The total protein output per farm was 30 tons, with a variation between 6.9 and 61.6 tons corresponding to the average production of  $1645 \text{ kg ha}^{-1}$  or  $5.1 \text{ GJ ha}^{-1}$ . The protein energy ratio (PER) was determined to be  $0.6 \pm 0.1$ , that is 60 MJ of total energy input was required to produce 100 MJ of milk protein energy. The PER ranged between 0.5 and 0.8 and it represents 6.3 less times then the OER.

Gross  $\text{CO}_2$  emissions from each surveyed farm, because of total energy use, varied between 97 and 2183 ton, with a mean value of 365 tons. The emission was  $2.4 \pm 1.8 \text{ kg}$  of  $\text{CO}_2$  per kg of milk solids production, or  $14.7 \pm 11 \text{ tons ha}^{-1}$ .

### Feedstuff, fertilizer and fuel input

Feedstuff proved to be one of the most significant determinants of total energy input of this survey. Fertilizer input, particularly nitrogen, is also an important input, as well as fuel. Consequently, indicators of feedstuff, fertilizer and fuel use are reported separately (Table II). On the surveyed farms, there was a dominant use of synthetic fertilizer mixtures with acid reaction.

TABLE II – AVERAGE FEEDSTUFF, NUTRIENT AND FUEL APPLICATION RATES.

<i>Indicator</i>	<i>Mean Value <math>\pm</math> 95 Percent Confidence Interval</i>	<b>Range</b>
Feedstuff application rate ( $\text{kg feed cow}^{-1}$ )	$1037.8 \pm 308.4$	342.7 - 1737.5
Feedstuff per litre of milk ( $\text{kg litres}^{-1}$ )	$0.19 \pm 0.04$	0.12 - 0.31
Feedstuff per unit area ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	$1906.4 \pm 755.7$	197.5 – 4275.7
Nitrogen Application Rate ( $\text{kg N ha}^{-1}$ )	$139.5 \pm 58.2$	21.5 - 295.9
Phosphorus Application Rate ( $\text{kg P ha}^{-1}$ )	$25.3 \pm 9.9$	5 - 56.4
Potassium Application Rate ( $\text{kg K ha}^{-1}$ )	$33.6 \pm 20.6$	5.3 - 103.8
Fuel use ( $\text{litres ha}^{-1}$ )	$297.5 \pm 104.9$	115.2 – 653

### Importance of independent variables

Feedstuff, fertilizer and fuel usage accounted for 86.5% of the energy intensity. Overall, in the surveyed farms in the surveyed farms the total of these three components varied between  $0.3$  and  $4.1 \text{ GJ ha}^{-1}$  and other indirect energy inputs varied between  $0.09$  and

0.36 GJ ha<sup>-1</sup>. From the total amount of purchased seeds, just 0.7% were legumes, and the remained 99.3% were grasses (maize and rye-grass, mainly).

Table III shows the correlation coefficients between the main dependent and independent variables in the study. Results show that the energy intensity (GJ ha<sup>-1</sup>) was moderately correlated with the production intensity and highly correlated with the animal feedstuff. There was a weak correlation between energy intensity and nitrogen application rate, but moderate between nitrogen application rate and production intensity.

TABLE III – CORRELATION COEFFICIENTS FOR PRINCIPAL DEPENDENT AND INDEPENDENT VARIABLES.

	A	B	C	D	E	F	G	H
A	1							
B	-0.004	1						
C	-0.02	-0.60	1					
D	0.86	0.23	-0.50	1				
E	0.22	0.88	-0.71	0.50	1			
F	0.97	-0.01	-0.11	0.89	0.29	1		
G	0.001	-0.43	0.30	-0.16	-0.65	0.97	1	
H	0.43	0.20	-0.62	0.69	0.27	0.45	0.13	1

A – Energy intensity; B- CO<sub>2</sub> Emission Intensity; C- Overall Energy Ratio; D- Production Intensity; E- Stocking Density; F- Feedstuffs; G - Indirect Energy for Fertilizers; H - Nitrogen Application Rate

The gross CO<sub>2</sub> emission intensity (ton CO<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup>) is moderately correlated with stocking rate. Production intensity (kg MS ha<sup>-1</sup>) was moderately correlated with the stocking density and weakly correlated with nitrogen application rate.

Although total fuel usage makes up 13% of the total primary energy requirement, there was only a moderate correlation between fuel usage intensity and energy intensity.

### Input costs

Fig. 4 represents the different average input costs expressed as € ha<sup>-1</sup> for the surveyed farms. For the total number of farms, feedstuffs represented 45% of the total costs, fertilisers 18%, machinery and other capital 17%, fuel 12%, agrochemicals 3% and others 5%. For the cost of each litre of milk, only including the studied direct, indirect and capital inputs, we found an average of 0.08 ± 0.02 €, for a minimum of 0.05 € and a maximum of 0.12 €.

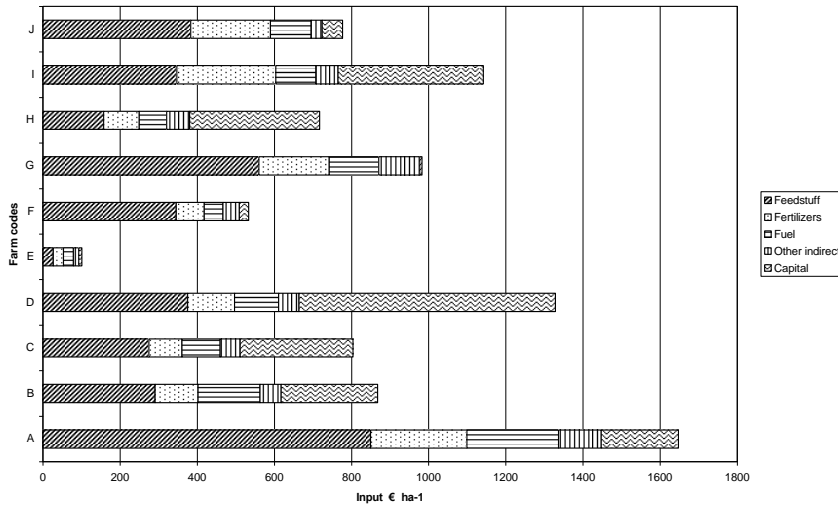


Figure 4 – FALTA O TEXTO

## DISCUSSION

The primary objective of this study was to develop baseline energy indicator values of the dairy production sector at Terceira Island, Azores, based on a farm survey. This was achieved despite the restricted number of farms and may provide a useful basis for future comparison. The calculated indicators can also be combined with similar ones from the dairy processing industry, to provide base level information on the energy requirement and CO<sub>2</sub> emissions associated with the export of dairy products. In addition, the current indicators can be compared with data from similar studies carried out in other countries, in order to assess the standing of local dairy producers as compared to international competitors concerning the overall effectiveness of energy utilisation.

From this study, the base energy requirement for producing milk in Terceira Island was 30.7 MJ kg<sup>-1</sup> of milk solids (MS), with a tolerance of  $\pm 5.1$  MJ kg<sup>-1</sup> MS, at the 95% confidence level. This corresponds to an overall energy ratio of  $3.8 \pm 0.6$ , that is 3 units of primary energy required to produce 1 unit of calorific value (food energy) in the milk leaving the farm. Gross emissions of CO<sub>2</sub> because of energy utilisation are on average 14.7 tons of CO<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> or 2.4 kg kg<sup>-1</sup> MS. The most significant energy requirements for the average farm are associated with the manufacture and conservation of feedstuffs (64.5%), supply and use of liquid fuels (13.1%) and supply of artificial fertilizers (9.0%). Production of all capital inputs accounts for a further

1.7% of total primary energy requirements, with the balance being used for the production of other indirect inputs, such as agrochemicals, seeds and electricity as a direct input.

For a mean utilized land area of  $19.2 \pm 5.9$  ha, the average feedstuff used was  $1906.4 \pm 755.7$  kg ha<sup>-1</sup>, the nitrogen application rate was  $139.5 \pm 58.2$  kg N ha<sup>-1</sup> and the fuel use was  $297.5 \pm 104.9$  litres ha<sup>-1</sup>. These inputs resulted in a milk production of  $5405.3 \pm 1011.9$  l cow<sup>-1</sup> or  $9981.8 \pm 3391.8$  l ha<sup>-1</sup>, with a value of about 0.08 € per l.

Despite good natural conditions, renewable energy sources were not used in the surveyed farms. This means that the dairy farmers are highly vulnerable to fossil energy supply reliability and price fluctuations, since fossil fuels make up the majority of energy requirement for the manufacture of indirect and capital inputs.

A historical study conducted by Oltenacu and Allen (1980), reported data from 1975 in the USA. Results presented an overall energy ratio (OER) of 2.2 on what was considered very intensive dairy production systems. Pimentel (1997) has revised this estimate upward to 2.8 (based on a protein energy ratio of 14).

Uhlin (1998) reported that in Sweden the OER for dairy production was 2.7 in 1972 and had fallen to 2.4 in 1993. Halberg *et al.* (1998) studied the energy balance of 10 organic and 5 conventional dairy farms and calculated an average total energy requirement of 3.0 GJ tons<sup>-1</sup> of milk. This is equivalent to approximately 37 MJ kg<sup>-1</sup> milk solids or an OER of 0.96, varying from 0.67 to 1.25 with the lowest values recorded on organic farms and the highest on conventional farms with irrigation.

Wells (2001), for New Zealand, from a study of surveyed farms, reported that the OER for dairy production was 0.65 and 24.6 MJ kg<sup>-1</sup> milk solids, but for the national average dairy farm was 0.59 and 22.2 MJ kg<sup>-1</sup> milk solids. According to the same author, in New Zealand the average percent of renewable energy is about 15% and the manufacture and supply of artificial fertilizers, generation and use of electricity and production, supply and use of liquid fuels, are the most significant energy requirements. Irrigation however, appears to be the single factor to determine the overall energy ratio raking of dairy farms, with a value greater than the national average.

Meul *et al.* (2005) studied the eco-efficiencies of a representative set of specialized dairy farms in Flanders (Belgium), for the period 1989-1990 and 2000-2001. Eco-efficiency was assumed as a measurement of a combination of N use efficiency (1 milk kg<sup>-1</sup> N surplus) is the ratio between the farm's product outputs (litres of produced milk) and the farm-gate N surplus (= N input – N output). For the authors, energy use efficiency (1 milk 100 MJ<sup>-1</sup>) is the

---

amount of produced milk per unit of total (direct + indirect) energy input. For the described situation, the use of fertilizers and concentrates account for about 60% of the total energy use on farms in 2000-2001 and fuel represented 22% of total energy use. For a representative set of 10 farms, the average utilized area was 36.7 ha; average nitrogen application rate of 113 kg N ha<sup>-1</sup>; feedstuff use of 2087 kg ha<sup>-1</sup>; fuel use of 166 l ha<sup>-1</sup>; stocking density of 3.14 cows ha<sup>-1</sup>; milk production of 6501 l cow<sup>-1</sup>, or 12997 l ha<sup>-1</sup>. The total energy input was 33.4 GJ ha<sup>-1</sup>. The energy use efficiency (1 milk 100 MJ<sup>-1</sup>) was 39.3. The gross value added per litre of milk was 0.28 €. The authors concluded that a high level of eco-efficiency on Flemish dairy farms could be achieved through a combination of a high milk production per ha and high milk production per cow, either or not, combined with a high stocking density, a low energy input, a limited use of mineral fertilizers and concentrates and a limited fuel use.

From these international data, we could conclude that the surveyed farms represent an intensive farming system, comparable to other intensive dairy farm systems in Europe or elsewhere. In terms of economic results, the situation is quite favourable for the analysed farms.

However, traditional crop rotation has been abandoned in favour of gramineous species prevalence, demanding high rates of N supply. More milk per unit of area or per cow means more input of imported feed, relegating the large potential of local natural resources. The most important question has to do with efficiency. In terms of energy utilization, it seems that on average, the set of chosen farms it is not efficient, not sustainable in a future perspective, limiting the sector's competitive capacity. More work has to be done in order to get more representative data.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank the following persons for valuable help, comments and information: Eng. Manuel Jorge Melo from Terceira Farmers Association; Professors Alfredo Borba and José Matos, colleagues from the University of the Azores.

## REFERENCES

Björklund, J., Limburg, K. and Rydberg, T., 1999. Impact of production intensity on the ability of the agricultural landscape to generate ecosystem services: an example from Sweden. *Ecologic Economics*, 29: 269-291.

---

- Cederberg, C. and Mattson, B., 2000. Life cycle assessment of milk production – a comparison of conventional and organic farming. *J. Cleaner Prod.*, 8: 49-60.
- Cleveland, C., 1994. Re-allocating work between human and natural capital in agriculture: examples from India and the United States. In: Jansson, A., Folke, C., Costanza, R. (Eds.). *Investing in Natural Capital*. Island Press, Covelo, California, pp. 179-199.
- Conforti, P. and Giampietro, M., 1997. Fossil energy use in agriculture: an international comparison. *Agricult. Ecosyst. Environ.*, 65: 231-243.
- DREPA, 2006. Direção Regional de Estudos e Planeamento dos Açores. Situação Socioeconómica 2004. Accessed on: <http://www.azores.gov.pt/Portal/pt/entidades/sravp-drepa/textoImagem/Situacao+Socioeconomica.htm>
- Fluck, R.C., 1992. *Energy in Farm Production*. Elsevier, Amsterdam, 367 p.
- Grönroos, J., Seppälä, J., Voutilainen, P., Seuri, P. and Koikkalainen, K., 2006. Energy use in conventional and organic milk and rye bread production in Finland. *Agricult., Ecosyst. and Environ.*, 117: 109-118.
- Halberg, N., 1998. Characterising high intensity livestock systems – identifying indicators of resource use, environmental impact and landscape quality. In: Williams, S., Wright, I. (Eds). *The identification of types of livestock systems*, ELPEN Workshop, Karpenisi, Greece. Accessed on: <http://www.macaulay.ac.uk/elpen/pdf/halberg.pdf>.
- IPCC Guidelines, 1997. Revised 1996 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. Accessed on: <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/gl/invs1.htm>.
- Jollands, N., Lermit, J. and Patterson, M., 2004. Aggregate eco-efficiency indices for New Zealand – a principal components analysis. *J. Environ. Manag.*, 73: 293-305.
- Meul, M., Nevens, F., Verbruggen, I., Reheul, D. and Hofman, G., 2005. Eco-efficiency of specialised dairy farms in Flanders. Accessed on: <http://www.kuleuven.ac.be/stedula/nl/publicaties/meul.pdf>.
- Oltenucu, P. and Allen, M., 1980. Resource-cultural energy requirements of the dairy production system. In: Pimentel, D., *Handbook of Energy Utilisation in Agriculture*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 475 p.
- Pimentel, D., 1997. Livestock Production: Energy Inputs and the Environment. In: Scott, S. and Xin, Z., *Proc. 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Canadian Society of Animal Science*, Montreal, pp. 16-26.
- Refsgaard, K., Halberg, N. and Kristensen, E.S., 1998. Energy utilization in crop and dairy production in organic and conventional livestock production systems. *Agricult. Syst.*, 57: 599-630.
- Rydberg, T. and Haden, A., 2006. Energy evaluations of Denmark and Danish agriculture: assessing the influence of changing resource availability on the organization of agriculture and society. *Agricult. Ecosyst. Environ.*, 117 (2-3). 145-158.
- SREA, 2006. Serviço Regional de Estatística dos Açores. Séries Estatísticas 1994-2004. Accessed on: <http://srea.ine.pt/>.
- Uhlin, H., 1998. Why energy productivity is increasing: an I-O analysis of Swedish Agriculture. *Agricult. Syst.*, 56: 443-465.
- WBCSD, 2000. *Eco-efficiency. Creating more value with less impact*. World Business Council for Sustainable Development, North Yorkshire. Accessed on: <http://www.wbcd.org>.
-



Wells, D., 2001. Total energy indicators of agricultural sustainability: dairy farm case study. Technical paper 2001/3. Ministry of Agriculture and Forestry, Wellington. Accessed on: <http://www.govt.nz>.

## LOCAL-BREED CATTLE-RAISING AS A MEANS OF REALISING THE POTENCIAL OF MOUNTAINOUS ZONES

**A.A. MARTA-COSTA e A. DINIS POETA**

*Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Departamento de Economia, Sociologia e Gestão. Av. Almeida Lucena n.º 1, 5000-660 Vila Real, Portugal. e-mail: amarta@utad.pt*

*(Recepção: 26 de Abril de 2007; Aprovação: 15 de Junho de 2007)*

### ABSTRACT

There are agricultural practices that have manifestly positive effects on the environment around us, and that contribute to the preservation of certain plant and animal ecosystems and, above all, are responsible for the agricultural landscape that characterizes the cultural inheritance of our ancestors. In this work we intend to empirically demonstrate the basic role of practices cattle raising such as in the preservation of the environment and the way that this activity can constitute an additional source of economic value for those who practice it, in mountain areas, contributing, in this manner, to the sustainability of such territories. Using the results of questionnaire survey, official statistics, information from specific literature as well as data collected via direct contacts with farmers and key informants in a wide range of areas, we present some environmental, economic and social indicators of the effects of cattle raising, in mountain areas. The results obtained seem to confirm the perception that the raising of cattle not only provides further sources of wealth for cattle economic agents, but also has positive environmental effects, in the areas considered.

**Keywords:** environmental, economic and social indicators, highland cattle, local breeds, sustainability.

## VALORIZAÇÃO DE ZONAS DE MONTANHA ATRAVÉS DA EXPLORAÇÃO DE GADO BOVINO

### RESUMO

Existem determinadas práticas agrícolas que são manifestamente positivas para o meio que nos rodeia, contribuindo para a preservação de certos ecossistemas vegetais e animais e, acima de tudo, responsáveis pela paisagem rural que caracteriza a herança cultural de nossos antepassados. Neste trabalho pretendemos demonstrar, empiricamente, o papel fundamental dessas práticas, nomeadamente, a exploração de gado bovino na preservação do ambiente e a forma como esta actividade pode constituir uma mais valia económica para quem a pratica, em áreas de montanha, contribuindo deste modo, para a sustentabilidade de tais territórios. Utilizando inquéritos elaborados para o efeito, dados publicados em estatísticas oficiais,

informações referenciadas na literatura específica conjuntamente com contactos pessoais com agricultores e peritos de diversas áreas, apresentamos alguns indicadores de âmbito ambiental, económico e social sobre os efeitos da exploração bovina, em áreas de montanha. Os resultados obtidos parecem confirmar a percepção de que a exploração do gado bovino apresenta uma maior valia económica, e consequentemente ambiental, para as áreas consideradas.

**Palavras-chave:** indicadores ambientais, económicos e sociais, raças bovinas, sustentabilidade.

## INTRODUÇÃO

As aldeias de montanha, em geral muito afastadas dos centros urbanos, caracterizam-se, de acordo com Miranda (2000), por apresentarem magníficas paisagens, património riquíssimo e seculares tradições, sendo também o último refúgio de muitas raças autóctones, de fauna e de flora selvagens. Não usufruindo de fáceis acessibilidades, os povoamentos são concentrados, com ruas estreitas, alojamentos com fracas condições de habitabilidade, rigor climatérico, orografia agreste e acentuado despovoamento. Estas características revelam uma pobreza intrínseca às áreas de montanha, aferida pelo baixo valor dos parâmetros relativos à qualidade de vida das suas populações; pelos parcos rendimentos económicos e pela pouca qualidade dos solos.

Nestas circunstâncias, um possível cenário de abandono das áreas de montanha acarretará consequências desastrosas não só para a população local mas também para a população em geral. As razões apontadas são sobejamente conhecidas, mas a principal prende-se com a falta de competitividade dos seus produtos nos mercados, o que impede a realização de benefícios económicos e a retirada de mais valias. O possível abandono levará, inevitavelmente, à alteração da paisagem que, para além do inegável valor turístico, é a forma de preservação da fauna e flora, evitando a propagação de matos e floresta. Este último aspecto contribuirá não só para a alteração ambiental, como poderá ser, também, uma forma de acumulação de carga energética, propagadora de incêndios, resultante da ausência de limpeza destas áreas quer através do manuseamento humano quer do pastoreio do gado.

Por último, a degradação ambiental arrastará, inevitavelmente, a componente económica, podendo originar o despovoamento humano ainda mais acentuado.

Potenciar as áreas de montanha como factor de desenvolvimento, assente na humanização do território, com total respeito pelo espaço natural, é um desafio que urge vencer, visando salvaguardar a cultura e história que estas serras têm confiadamente guardado através das gerações.

Segundo Miranda (2000), no âmbito dos “Contributos para a Definição de uma Estratégia de Intervenção em Zonas de Montanha”, para preservar estas áreas, já não é suficiente resolver, apenas, os problemas das acessibilidades das aldeias, das suas infra-estruturas ou das suas habitações, mas é necessário actuar ao nível de outros aspectos considerados essenciais para a sua revitalização. É o caso das questões económicas, resultado dos baixos rendimentos retirados da agricultura devido à fraca valorização dos seus produtos e pela quase total ausência de rendimentos complementares (Miranda, 2000).

Algumas actividades económicas têm renascido como capazes de potenciar o valor destes territórios. É o caso, por exemplo, do aproveitamento das áreas mais inóspitas para a exploração de gado bovino. Nalguns casos, verifica-se mesmo que esta actividade é a principal fonte de receitas das famílias-explorações, através da venda de crias, acrescidas dos prémios e subsídios atribuídos a este sistema produtivo (Silva, 2000).

Neste sentido, tentamos retratar aqui situações, que revelam a importância da agricultura, através da exploração de gado bovino, quer como fonte principal de rendimento quer como actividade económica complementar quer ainda como meio eficaz para a sustentabilidade sócio-ambiental de áreas agrestes como as de montanha.

A criação de gado bovino nas áreas de montanha, essencialmente as raças autóctones, deve ser, em nosso entender, incentivada pelas seguintes razões:

- a rusticidade permite identificá-las como as mais bem adaptadas às difíceis condições destas áreas, capazes de suportar os rigores climáticos e a escassez do alimento de certas alturas do ano, sendo também, as mais bem preparadas para retirar o máximo de proveito das condições de pastoreio existentes (Miranda, 2000);
- os encargos comparativos de exploração destes animais são reduzidos, pois passam a maior parte do ano em pastoreio livre, na serra. A alimentação dos vitelos é à base de leite materno nos primeiros meses de vida. A utilização de ração é nula ou quase insignificante, apenas é administrada a vitelos e por vezes às vacas aleitantes, em baixa quantidade. Não obstante, pode considerar-se que se tratam de animais cuja alimentação é natural (passam a maior parte do ano em pastoreio livre na serra) (Silva, 2000);
- devido à sua elevada rusticidade, poderemos também induzir que encargos oriundos com assistência veterinária e uso de fármacos tornam-se, também eles, muito reduzidos;

- nestas condições, pese embora os baixos encargos, os rendimentos são também menores, mas constituem, nestes casos, em comparação com o abandono destas áreas, uma importante mais valia económica;
- outros benefícios para a família são ainda imputados ao sistema, nomeadamente, o auto-emprego (o custo de oportunidade da mão-de-obra, na maior parte dos casos é zero), o auto-consumo (leite e carne) e o aproveitamento do estrume e da tracção animal como factores de produção (Silva, 2000);
- finalmente, o aproveitamento turístico das zonas de montanha poderá promover a melhoria das condições de habitabilidade das populações residentes, quer pela retirada dos animais das aldeias quer pela recuperação das casas tradicionais quer, ainda, pela criação de actividades complementares ao turismo. A melhoria do nível de vida das populações serranas pode não ser uma miragem (Miranda, 2000).

Frente à evidente importância da exploração do gado bovino para a preservação das áreas de montanha, em termos económicos, ambientais e sociais, tentaremos mostrar, de forma rigorosa, mas cautelosa, de entre as raças autóctones e não autóctones (raças exóticas) bovinas qual a que resulta melhor, nas três dimensões consideradas, para as áreas de montanha.

## **METODOLOGIA**

A recolha de informação foi realizada através de entrevistas aos proprietários/gestores das explorações agrárias, complementada com a observação directa das explorações e recolha de elementos fornecidos pelos mesmos (relatórios de gestão da exploração e/ou registos contabilísticos; declarações de IRS ou IRC; parcelário (P1) e impressos de candidatura aos subsídios – Modelos A e N, relativos a diversos anos). Os inquéritos foram realizados a cerca de trinta por cento das explorações de gado bovino localizadas no nível hipsométrico montano da área do solar da raça bovina Maronesa, com encabeçamento igual ou superior a cinco bovinos adultos (dado o número de animais em crescimento encontrar-se em constante dinâmica, tomámos como referência o número de animais adultos ), sobre as actividades realizadas em 2004, totalizando quarenta e duas unidades de exploração.

O andar montano é aquele cuja altitude é superior a setecentos metros, conjugada com declive acentuado (Colaço-do-Rosário, 1998).

O solar de origem da raça bovina Maronesa coincide com a área limitada pelas serras do Marão-Alvão-Padrela. Nesta área são abrangidos na íntegra os concelhos de Alijó, Mondim de Basto, Murça, Ribeira de Pena; Sabrosa; Vila Pouca de Aguiar e Vila Real (Alves, 1993). Actualmente, em áreas adjacentes às referidas, tem-se verificado a expansão da área de produção do bovino Maronês. Estas áreas não foram por nós consideradas devido ao facto de se sobrepor ao solar de origem de outras raças autóctones portuguesas, caso das raças Barrosã e Mirandesa, e por consistirem, de igual forma, áreas de dispersão daquelas raças.

As explorações com número igual ou inferior a quatro bovinos adultos auferem, com a actividade bovina, uma margem líquida inferior ao salário mínimo nacional. Desta forma a sustentabilidade destas explorações não se evidencia, ao menos na vertente económica, não constituindo, por isso, a base do modelo que pretendemos recriar para explorações sustentáveis. Por outro lado, pretendia-se que a actividade bovina fosse uma das actividades principais das explorações em estudo.

Foram identificados três grupos de explorações agro-pecuárias de acordo com a raça bovina e seu respectivo sistema de exploração:

- **GRUPO RAÇA MARONESA (M):** explorações cujo gado maronês adulto corresponde a mais de 95% do gado bovino adulto presente;
- **GRUPO OUTRAS RAÇAS (O):** explorações cujo somatório do gado bovino adulto de outras raças, com exclusão da maronesa, corresponde a mais de 95% do gado bovino adulto presente;
- **GRUPO RAÇAS MISTAS (Mx):** explorações de gado bovino de raça maronesa em simultâneo com bovinos de outras raças, cuja percentagem de bovinos adultos maroneses é igual ou superior a 25% e inferior a 75%.

O contributo do gado bovino nas explorações em áreas de montanha foi medido através de vinte e seis indicadores distribuídos por área económica (9), ambiental (8) e social (9), que se apresentam no Quadro I, II e III, respectivamente.

Os indicadores seleccionados resultaram da identificação dos pontos críticos para a sustentabilidade dos sistemas de exploração em estudo, derivados da comparação entre si, para além dos conhecimentos que se dispõem sobre o sector bovino adquiridos por meios directos e indirectos, da consulta de literatura e de trabalhos já realizados nesta matéria e dos

contactos formais e informais realizados com peritos/especialistas de diversas áreas, bem como com os agentes e empresários agrários.

QUADRO I - INDICADORES AMBIENTAIS SELECIONADOS.

ÁREA	INDICADORES/ÍNDICES
Ambiental	(1) Encabeçamento animal (CN/Ha) <sup>(1)</sup> (2) Bem-estar animal (%) <sup>(2)</sup> (3) Concentrados comerciais (kg)/CN bovina (4) Balanço em nutrientes (kg) / SAU (ha) <sup>(3)</sup> Azoto (N) Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) Potássio (K <sub>2</sub> O) (5) Aplicação de fitofármacos (Kg s.a.) / SAU (Ha) (6) Contributo para a degradação física do solo (H/Ha) <sup>(4)</sup> (7) Boas práticas agrícolas (%) <sup>(5)</sup> (8) CN bovinas autóctones no total de CN bovinas (%)

(1) O encabeçamento animal foi calculado por unidade de Superfície Forrageira, definida no Despacho Normativo N.º 33/2005 de 28-06-2005, DR N.º 122, I Série B (MADRP, 2005).

(2) Para avaliar o bem-estar animal efectuou-se um conjunto de questões, complementadas pela observação dos animais e suas instalações. Os grupos de questões presentes no inquérito para avaliação do bem-estar animal foram identificados através da consulta da legislação sobre o tema (CE, 1998), além de contactos pessoais informais com especialistas da área. Foram identificados os seguintes grupos de questões: liberdade de movimentos; instalações e alojamento; cama/local de repouso; condições higio-sanitárias; condições dos animais criados ao ar livre; tempo de permanência no alojamento e no exterior; alimentação; pastoreio; abeberamento; condição corporal; lesões e doenças; ataques de predadores; ordenha; manejo no trabalho; condução dos animais; percursos; transporte dos animais; práticas de manejo; recursos humanos; preocupação e conhecimento do criador sobre bem-estar animal. O valor aqui atribuído representa a proporção de aspectos favoráveis ao bem-estar animal relativamente ao total em análise.

(3) O balanço em nutrientes foi calculado tendo por base a metodologia usada no âmbito do Projecto "GREEN DAIRY - Atlantic Dairy Systems and Environment" (trabalho iniciado em 2003 e terminado em 2006, financiado pelo FEDER (Projecto INTERREG III B - ATLANTIC AREA). Nele participaram Instituições de Espanha, França, Irlanda, Portugal e Reino Unido, tendo como investigador responsável André Le Gall, do Institut de l'Élevage (França). O investigador responsável, em Portugal foi o Prof. Henrique Trindade, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro). Considera-se, neste procedimento, a diferença, apenas, entre as saídas e as entradas dos nutrientes considerados numa dada exploração Institut de l'Élevage (1999). Os teores em azoto, fósforo e potássio de algumas rubricas intervenientes nesta análise foram obtidos através da USDA (2006).

(4) O contributo para a degradação física do solo é medido através da quantidade de tracção motora, em horas, por unidade de superfície.

(5) Avalia-se o número de boas práticas agrícolas, aplicáveis no âmbito das explorações beneficiárias das Medidas Agro-Ambientais e Indemnizações Compensatórias, que são desenvolvidas na exploração (MADRP, 2002).

Os indicadores ambientais seleccionados medem os principais factores de protecção do ambiente e de preservação dos recursos naturais, que distinguem os três grupos de

explorações definidos. Referimo-nos, essencialmente, ao esgotamento dos recursos naturais, à poluição ambiental e à preservação da biodiversidade através da exploração de raças bovinas autóctones.

QUADRO II - INDICADORES ECONÓMICOS SELECIONADOS.

ÁREA	INDICADORES/ÍNDICES
Económica	(1) Produtividade da mão-de-obra (€/UTA) <sup>(1)</sup> (2) Remuneração do trabalho relativamente ao salário mínimo nacional <sup>(2)</sup> (3) VAL(€/CN) <sup>(3)</sup> (4) Capacidade de competição (€/Ha) <sup>(4)</sup> (5) Confiança económica (%) <sup>(5)</sup> Sensibilidade dos resultados a variações adversas no preço dos produtos Sensibilidade dos resultados a variações adversas no preço dos factores de produção (6) Relação benefícios-custos com bovinos (7) Rendimento do Empresário e Família (REF) (€/CN bovina) <sup>(6)</sup> (8) Grau de dependência de factores de produção externos (%) <sup>(7)</sup> (9) Grau de endividamento (%) <sup>(8)</sup>

(1) A produtividade da mão-de-obra é medida através da relação entre o Valor Acrescentado Bruto (VAB) e a mão-de-obra utilizada expressa em Unidades Trabalho Anuais (UTA), como indica o documento da European Community (2006) O VAB representa a diferença entre o Produto Bruto da exploração e os encargos correspondentes às compras de bens e serviços ao exterior (Avillez *et al.*, 1988).

(2) A remuneração do trabalho é representada pelo Rendimento do Trabalho. Calcula-se pela diferença entre o Produto Bruto e os encargos correspondentes às compras de bens e serviços ao exterior, taxas, impostos e prémios de seguros, amortizações das máquinas, alfaias e benfeitorias e os encargos relativos aos capitais fundiários e de exploração, com base em valores considerados representativos quer do valor locativo da terra quer do custo de oportunidade do capital (Avillez *et al.*, 1988). Os encargos relativos à terra (juro do capital fundiário) foram obtidos através de consulta à Portaria n.º 186/2002, relativa aos valores máximos das rendas dos contratos de arrendamento rural.

(3) O Valor Actualizado Líquido (VAL) corresponde à diferença entre os benefícios e custos actualizados gerados durante o período de vida útil do investimento (Avillez *et al.*, 1988). Foi considerado um período de 15 anos que corresponde quer à idade média das vacas de raça Maronesa quer à vida útil média das máquinas e equipamentos utilizados, considerados como os investimento de maior importância realizados nas explorações sob análise. A taxa de actualização utilizada foi de 4%.

(4) A capacidade de competição é aqui traduzida pelo capital aplicado no aparelho de produção, com exclusão do valor da terra, já que é por unidade de superfície.

(5) Para avaliar a confiança económica procedeu-se à comparação do resultado líquido da exploração (Rendimento do Empresário e Família) com o obtido quando o preço dos produtos desce 15% (oscilação frequentemente verificada pelos bovinicultores para os produtos da exploração) e quando o preço dos factores de produção sobe em igual proporção.

(6) O Rendimento do Empresário e Família representa o total dos valores que a família pode consumir sem diminuir a capacidade de produção da sua exploração e que resulta da participação dos elementos do agregado familiar na actividade agrária sob a forma de trabalho, de capitais e dos riscos assumidos pelo empresário. Resulta da diferença entre o produto bruto e os encargos reais, adicionado aos subsídios recebidos à actividade corrente (Avillez *et al.*, 1988).

(7) Para avaliar o grau de dependência de factores de produção externos mediu-se a relação entre os encargos com os factores de produção comprados e o custo com os factores de produção utilizados.

(8) O grau de endividamento revela a relação entre o capital alheio e o capital próprio utilizado na exploração.

Com os indicadores económicos pretendem avaliar-se a remuneração e rentabilidade dos factores de produção trabalho e capital; a confiança económica dos



mesmos; os rendimentos específicos da exploração de gado bovino e os rendimentos líquidos da unidade de produção; bem como o grau de autonomia das explorações através da dependência de factores de produção externos, incluindo o capital. Todos os indicadores aqui colocados foram avaliados para a situação com subsídio à actividade corrente, dado ser esta a situação existente para o ano em análise, e que, apesar de poder não ser sustentável no longo prazo, é, no entanto, aquela que levou à gestão preconizada pelos bovinicultores, em 2004.

É ainda de salientar que, apesar da amostra do estudo encontrar-se limitada a explorações com mais de cinco animais adultos, reconhecendo-se o seu contributo nas transacções monetárias locais, não se exclui, mesmo assim, a influência de uma economia de subsistência nos resultados obtidos.

QUADRO III - INDICADORES SOCIAIS SELECIONADOS.

ÁREA	INDICADORES/ÍNDICES
Social	(1) (Des)motivação na dedicação à exploração de bovinos (%) <sup>(1)</sup>
	Gosto pela actividade
	Introdução voluntária da actividade
	Sente-se motivado
	(2) Sustentabilidade da actividade bovina (%) <sup>(2)</sup>
	Continuação sem subsídios
	Existência de descendentes
	Incluída nos projectos para filhos
	(3) Disponibilidade/vontade de mudança (%) <sup>(3)</sup>
	(4) Qualidade de vida (%) <sup>(4)</sup>
	(5) Satisfação laboral do bovinicultor e seu agregado familiar (%) <sup>(5)</sup>
	Bovicultor
	Agregado familiar
	(6) Satisfação de residência do bovinicultor e seu agregado familiar (%) <sup>(5)</sup>
	Bovicultor
Agregado familiar	
(7) Postos de trabalho criados (UTA)	
(8) Participação dos bovinicultores em aspectos organizativos (%) <sup>(6)</sup>	
Número de organizações	
Acção nas organizações	

(1) O gosto pela actividade; as razões de introdução da mesma na exploração, no sentido de conhecer se a opção por esta actividade foi uma escolha livre, voluntária e consciente ou se, por outro lado, foi induzido pelos progenitores ou se consistiu na única alternativa económica possível de realizar, e a existência de motivos para o seu desenvolvimento foram questionadas directamente ao bovinicultor. O valor obtido representa a proporção de respostas favoráveis à sustentabilidade da actividade.

(2) A sustentabilidade potencial da actividade bovina no futuro foi medida através da proporção de respostas favoráveis dadas pelos bovinicultores a três questões: continuação do desenvolvimento da actividade sem subsídios; existência de descendentes para a manutenção da mesma e inclusão da actividade bovina nos projectos planeados para os seus filhos. O valor obtido representa a proporção de respostas favoráveis à sustentabilidade da actividade.

(3) A disponibilidade/vontade de mudança de aspectos ligados à actividade bovina pela parte do bovinicultor, tais como experimentação de alimentos novos, de cruzamentos de raças, da inseminação artificial, de sementes novas, de rotações culturais, de associações de culturas; alteração dos períodos e duração do pastoreio, das épocas de fertilização, das práticas de

combate às infestantes, da duração das regas; utilização de máquinas e equipamentos; entre outros; foi conhecida através das suas respostas a um conjunto de questões sobre o tema do indicador. O valor obtido representa a proporção de indivíduos com respostas favoráveis à mudança/adaptação.

(4) A qualidade de vida foi medida através de indicadores relativos ao conforto habitacional; aos aspectos sócio-culturais; à saúde; ao lazer e à envolvente sócio-ambiental do criador e seu agregado familiar. O valor aqui atribuído representa a proporção de aspectos favoráveis à qualidade de vida relativamente ao total em análise.

(5) Contabilizou-se o número de respostas favoráveis face ao total.

(6) A participação dos bovinicultores em aspectos organizativos foi medida directamente por inquérito, através da identificação do número de organizações agrárias a que se encontram associados, bem como da acção que desempenham ou que gostariam de desempenhar nas mesmas. Neste último caso, o valor atribuído representa a proporção de bovinicultores com papel activo nas organizações a que pertence.

Os factores de (des)motivação da actividade, que influenciam a sua sustentabilidade, a criação de emprego bem como a inserção dos bovinicultores em organizações sectoriais traduzem os principais indicadores sociais que poderão afectar a manutenção da actividade actual e no futuro.

Importa referir algumas das limitações dos indicadores apresentados resultantes, essencialmente, da recolha de informação junto dos empresários agrários. É de referir a ausência de registos da parte dos mesmos sobre as suas actividades, encontrando-se, na generalidade, apenas arrecadados o parcelário da exploração e os impressos de candidatura aos subsídios à exploração. São em número reduzido aqueles que utilizam um sistema de contabilidade ou que realizam registos contabilísticos.

Este facto levou a uma alteração do horizonte temporal para a colheita de dados prevista, inicialmente, para os últimos três anos civis. Seleccionámos, por isso, o ano de 2004 para a recolha de dados nas explorações, por ser o mais recente (a recolha dos dados foi realizada em 2005). Reduzir o período temporal não nos pareceu incorrecto dado que, de acordo com os bovinicultores, os dados das suas explorações têm-se mantido estáveis, nomeadamente os factores de produção com níveis de utilização idênticos nos últimos anos, dadas as pequenas e/ou nulas alterações verificadas nos processos tecnológicos. Além disso, conseguimos obter, nalguns casos, as candidaturas aos subsídios também para 2003 e 2005, o que nos permitiu confirmar as declarações dos proprietários relativamente à evolução das suas explorações.

Estamos conscientes, por isso, de que algumas das conclusões serão apenas preliminares. Contudo, o desejo que sentimos de continuar a aprofundar o estudo da sustentabilidade das explorações agro-pecuárias baseadas nos bovinos autóctones, permitir-

nos-á, por certo, efectuar correcções sucessivas a erros ou omissões agora, eventualmente, cometidos.

## RESULTADOS

Os indicadores ambientais, económicos e sociais seleccionados foram mensurados individualmente por explorações consideradas, apresentando-se nos Quadros IV, V e VI os resultados obtidos para os três grupos de explorações considerados. Todos os indicadores foram relativizados, tomando-se como sistema de referência o que explora a raça bovina autóctone Maronesa (M), adoptando, este caso, o índice 100.

Apresentam-se também as médias dos indicadores por áreas ambiental, económica e social, no sentido de permitir avaliar o contributo de cada dimensão na sustentabilidade obtida (Quadro VII).

Nesta fase de trabalhos não foram, ainda, consideradas ponderações entre os parâmetros em análise, o que poderá vir a induzir a alterações no resultado final.

QUADRO IV - RESULTADOS OBTIDOS PELOS INDICADORES AMBIENTAIS SELECIONADOS E RELAÇÃO ENTRE GRUPOS (GRUPO RAÇA MARONESA = ÍNDICE 100).

Indicadores/Índices	M	Mx	O	Mx/M	O/M	
Encabeçamento animal (CN/Ha) <sup>(1)</sup>	0,829	0,880	0,675	94,210	122,785	
Bem-estar animal (%)	68,216	73,450	66,605	107,671	97,638	
Concentrados comerciais (kg)/CN bovina <sup>(1)</sup>	131,166	1106,932	1599,791	11,850	8,199	
Balanço em nutrientes (kg) / SAU (ha)	Azoto (N)	-23,199	-26,274	-143,194		
	Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	-4,504	-12,182	-32,613	37,609	-446,961
	Potássio (K <sub>2</sub> O)	-7,939	-8,210	-47,594		
Aplicação de fitofármacos (Kg s.a.) / SAU (Ha) <sup>(1)</sup>	1,052	1,993	2,494	52,765	42,172	
Contributo para degradação física do solo (H/Ha) <sup>(1)</sup>	27,279	31,385	20,183	86,919	135,159	
Boas práticas agrícolas (%)	66,528	70,000	50,000	105,219	75,157	
CN bovinas autóctones no total de CN bovinas (%)	99,411	45,434	0,000	45,703	0,000	
Média dos indicadores ambientais				67,743	4,268	

(1) Quanto maior o valor do indicador pior será o seu contributo para a sustentabilidade. De forma a evidenciar este facto coloca-se a relação inversa.

Pela observação dos resultados obtidos verifica-se, como seria de prever, um impacte ambiental mais favorável do grupo da Raça Maronesa, seguido pelo grupo de Raças Mistas. Isto resulta, essencialmente, de um menor *input* de concentrados comerciais por animal, bem

como de fertilizantes e produtos fitofarmacêuticos e do predomínio de raças bovinas autóctones (Maronesa). É, no entanto, de salientar o menor encabeçamento e menores efeitos de degradação física, traduzida por horas de tracção por unidade de superfície, observados para o grupo de Outras Raças. Contudo, a densidade animal encontra-se mascarada pela área de baldio, que, na maioria dos casos, essencialmente para os bovinos com aptidão leiteira, é apenas registada para permitir condições de elegibilidade para os subsídios relativos à extensificação animal, e, também, para usufruição de maior montante da ajuda monetária atribuída pelas “Indemnizações Compensatórias”.

QUADRO V - RESULTADOS OBTIDOS PELOS INDICADORES ECONÓMICOS SELECIONADOS E RELAÇÃO ENTRE GRUPOS (GRUPO RAÇA MARONESA = ÍNDICE 100).

Indicadores/Índices	M	Mx	O	Mx/M	O/M
Produtividade da mão-de-obra (€/UTA)	2629,585	1614,202	5717,669	61,386	217,436
Remuneração do trabalho relativamente ao salário mínimo nacional	1,341	0,849	1,270	63,322	94,686
VAL (€)/CN	6743,692	11542,773	8291,175	171,164	122,947
Capacidade de competição (€/Ha)	3487,504	2330,553	4801,342	66,826	137,673
Confiança económica (%)	86,847	83,127	62,369	96,056	78,372
Relação benefícios-custos com bovinos	2,327	1,978	1,860	85,011	79,916
REF (€)/CN	709,707	1173,345	741,974	165,328	104,547
Grau de dependência de factores de produção externos (%) <sup>(1)</sup>	20,913	27,825	37,274	91,260	79,314
Grau de endividamento (%) <sup>(1)</sup>	3,408	1,469	24,219	102,007	78,454
Média dos indicadores económicos				100,262	110,372

(1) Quanto maior o valor do indicador pior será o seu contributo para a sustentabilidade. De forma a evidenciar este facto coloca-se a relação inversa.

No âmbito dos indicadores económicos, e não obstante a ausência de mensuração dos custos económicos com as externalidades ambientais negativas, verifica-se, pelos resultados expostos, a superioridade do grupo de Outras Raças para os indicadores seleccionados. Isto deve-se, essencialmente, ao facto de neste grupo se incluírem as raças bovinas com aptidão leiteira, tendo, conseqüentemente, um produto adicional - o leite.

Exceptuam-se a remuneração do trabalho, quando comparado com o salário mínimo nacional, a confiança económica nos resultados, muito dependentes do preço atribuído ao leite e uma maior dependência de factores de produção provenientes do exterior, incluindo o capital. Devido ao valor reduzido dos investimentos o grupo Misto alcança um valor actual líquido superior, mas, em contrapartida, uma menor capacidade de competição, traduzida pelo capital aplicado no aparelho de produção por unidade de área.

Destacam-se, ainda, os benefícios provenientes da exploração dos bovinos que, em qualquer dos casos considerados, são superiores aos seus custos, considerando os subsídios usufruídos pelos mesmos. Observa-se, ainda, que esta relação benefícios-custos com os bovinos assume valores superiores para o grupo da raça Maronesa. Conclusão contrária retira-se com a observação quer do REF/CN quer do VAL/CN, o que se pode dever a vários factores, tais como o número total de animais explorados, a diversidade de actividades totais desenvolvidas e a aquisição de máquinas, que, em muitos casos, resulta não da necessidade das mesmas, mas do facto de a sua compra ser subsidiada. Convém referir que, neste trabalho, não consideramos a ajuda monetária atribuída para a aquisição das máquinas, usufruída por alguns bovinicultores, mas o seu valor integral, para que fossem asseguradas igualdades de circunstâncias.

QUADRO VI - RESULTADOS OBTIDOS PELOS INDICADORES SOCIAIS SELECIONADOS E RELAÇÃO ENTRE GRUPOS (GRUPO RAÇA MARONESA = ÍNDICE 100).

Indicadores/Índices		M	Mx	O	Mx/M	O/M
(Des)motivação na dedicação à exploração de bovinos (%)	Gosto pela actividade	100,000	100,000	100,000		
	Introdução voluntária da actividade	25,000	25,000	50,000	102,222	100,000
	Sente-se motivado	46,875	50,000	0,000		
Sustentabilidade da actividade bovina (%)	Continuação sem subsídios	57,576	75,000	0,000		
	Existência de descendentes	37,931	50,000	0,000	140,694	0,000
	Incluída nos projectos para filhos	41,667	66,667	0,000		
Disponibilidade/vontade de mudança (%)		45,714	50,000	100,000	109,375	218,750
Qualidade de vida (%)		67,072	74,922	71,402	111,703	106,455
Satisfação laboral do bovinicultor e seu agregado familiar (%)	Bovicultor	100,000	100,000	100,000		
	Agregado familiar	87,879	100,000	100,000	106,897	106,897
Satisfação de residência do bovinicultor e seu agregado familiar (%)	Bovicultor	97,143	100,000	100,000	104,596	104,596
	Agregado familiar	94,118	100,000	100,000		
Postos de trabalho criados (UTA)		1,802	1,500	2,000	83,225	110,967
Participação dos bovinicultores em aspectos organizativos (%)	Número de organizações	1,528	1,000	1,000		
	Acção nas organizações	5,882	0,000	0,000	32,727	32,727
Média dos indicadores sociais					98,930	97,549

Face aos indicadores sociais seleccionados não se observam diferenças acentuadas pelos diversos grupos de exploração sob análise. As relações calculadas apresentam valores próximos ao índice 100 detido pelo grupo da Raça Maronesa. Destacam-se, no entanto, que

os factores que influenciam directamente a sustentabilidade da actividade apresentam valores nulos para as explorações das Outras Raças, sendo a disponibilidade/vontade de mudança máxima para o mesmo grupo. O grupo da Raça Maronesa apresenta também maior participação em aspectos organizativos, concretizados pela conexão à Associação de Criadores do Maronês (ACM).

Visualizando-se o conjunto dos indicadores por área de impacte, no Quadro VII e Fig. 1, e assumindo igual peso para os mesmos, poderá concluir-se que as explorações com gado exclusivo da Raça Maronesa é o que melhor se adapta para a realidade do andar montano, pois os restantes dois grupos apresentam valores totais inferiores ao índice 100.

QUADRO VII - RELAÇÃO ENTRE OS INDICADORES AMBIENTAIS, ECONÓMICOS E SOCIAIS PARA OS GRUPOS IDENTIFICADOS (GRUPO RAÇA MARONESA = ÍNDICE 100).

Indicadores/Índices	Mx/M	O/M
Ambientais	67,743	4,269
Económicos	100,262	110,372
Sociais	98,930	97,549
Média	88,978	70,730

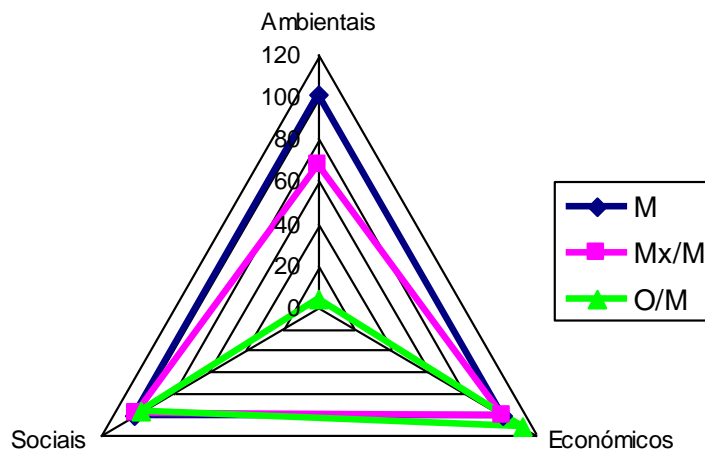


Figura 1 - Relação entre os indicadores ambientais, económicos e sociais para os grupos diferenciados (Grupo Raça Maronesa = Índice 100).

Caso se pretenda valorizar a vertente económica das explorações, dado ser este o factor que mais penaliza a realidade observada nas áreas de montanha, poderá atribuir-se um peso superior aos parâmetros económicos no entanto, neste trabalho não se visualizam diferenças significativas entre os resultados obtidos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A montanha encerra em si própria grandes dificuldades, que passam pelo seu isolamento, clima rigoroso e agreste topografia, mas em contrapartida são áreas de extraordinária beleza, último refúgio de muita da nossa fauna e flora selvagem e fonte importantíssima de biodiversidade genética, possuem uma cultura milenar, com uma arquitectura, usos, costumes e tradições muito próprias. São a principal fonte do nosso ambiente natural, da nossa água, da nossa energia e da nossa biodiversidade, que urge preservar. E esta preservação passa, em primeiro lugar pela manutenção das suas populações, às quais terão que ser dadas condições de vida capazes de as dissuadir ao êxodo generalizado, criando-se e desenvolvendo actividades económicas que consigam manter estas comunidades sustentavelmente e não criar museus ou “reservas de indígenas” para os cidadãos verem. A intervenção deverá passar naturalmente pelos aspectos diferenciadores e de mais valias destas áreas (Miranda, 2000).

Algumas actividades económicas têm surgido como capazes de potenciar o valor destes territórios. É o caso de, por exemplo, aproveitarem-se as áreas mais inóspitas para a exploração de gado bovino.

Pelo exposto neste trabalho, os resultados obtidos permitem confirmar a tendência empírica de que a exploração do gado bovino autóctone (de Raça Maronesa) apresenta de facto, uma mais valia, essencialmente ambiental, mas também económica, para as áreas de montanha. Quer os resultados económicos globais quer os sectoriais apresentam-se positivos para as situações em análise. No entanto, se o objectivo é enfatizar a vertente económica das explorações bovinas, pelos resultados observados conclui-se que a exploração de raças bovinas de outras raças é mais produtiva e mais eficiente, do ponto de vista económico.

Relativamente aos indicadores sociais conclui-se não existirem diferenças significativas para os grupos de exploração em análise, apresentando, os três grupos, valores próximos ao índice 100.

Uma possível combinação, em proporções adequadas, de várias raças bovinas, onde se incluem as autóctones, poderia, à partida, ser capaz de originar uma resposta adequada à sustentabilidade das áreas montanas.

Contudo, os resultados obtidos neste trabalho contrariam esta hipótese. Isto poderá dever-se a várias razões. Por um lado, verifica-se que as explorações integradas no grupo Misto têm custos mais elevados com os alimentos para o gado, comparativamente com o

grupo Maronês. Veja-se, por exemplo, a relação existente entre o nível de concentrados comerciais consumidos por Cabeça Normal bovina, de 1106,932 kg para o grupo de raças Mistas contra 131,166 para o grupo da Raça Maronesa.

Apesar de se localizar abaixo do grupo das Outras Raças (1599,791 kg/CN), refira-se que na maior parte destas explorações existe o produto – leite - que acresce bastante no rendimento das mesmas. Enquanto que, nas explorações Mistas, o leite, proveniente das raças bovinas com aptidão leiteira, não é comercializado, mas sim utilizado para alimentar os vitelos, de forma a elevar-lhes o peso.

Verifica-se também que alguns bovinicultores do grupo de Raças Mistas funcionam como verdadeiros “negociantes de gado” e/ou adquirem os animais para engorda, tornando-se a margem de lucro inferior à obtida quando o animal é nascido na exploração. Além disso, muitas das explorações do grupo de Raças Maronesas aqui consideradas dedicam-se, em simultâneo, à exploração de pequenos ruminantes, que contribuem fortemente para os resultados alcançados, devido aos menores custos decorrentes daquela actividade e do nível de subsídio auferido com a mesma.

Numa próxima fase deste projecto, tentar-se-á, recorrendo às técnicas de investigação operacional, planear um sistema de exploração de forma a conseguir encontrar um compromisso entre as dimensões onde se verificam diferenças mais acentuadas - sustentabilidade económica e sustentabilidade ambiental. Tratam-se, assim, de dois objectivos potencialmente conflituosos, porque a satisfação de um implica a penalização do outro, tendo em conta que, à luz da teoria económica, o rendimento obtido é função das quantidades de factores utilizados e que o principal impacto negativo da actividade no ambiente deriva da utilização desses mesmos factores. Coloca-se, deste modo, a questão de saber qual a solução a adoptar.

## BIBLIOGRAFIA

- Alves, V., 1993. Estudo sobre a “Raça Bovina Maronesa”. Situação Actual e Perspectivas Zootécnicas. Tese de Doutoramento. Vila Real. UTAD, 172p.
- Avillez, F.; Estácio, F. e Neves, M. C., 1988. Análise de Projectos Agrícolas no Contexto da Política Agrícola Comum. Lisboa: Banco Pinto & Sotto Mayor, 171p.
- Colaço-do-Rosário, M., 1998. Ensaio de Caracterização Agrária Integrada do Norte de Portugal no Contexto do Continente – Estudo com vista à Orientação do Agros na Perspectiva da Modernidade no Equilíbrio. Tese de Doutoramento, UTAD, Vila Real, 638p.



- Comunidade Europeia (CE), 1998. Directiva 98/58/CE do Conselho de 20 de Julho de 1998, relativa à protecção dos animais nas explorações pecuárias. Jornal Oficial N.º L 221 de 08/08/1998, pp. 0023-0027.
- European Community (EC), 2006. Regions: Statistical Yearbook. Luxemburgo, EUROSTAT.
- Institut de l'Élevage, 1999. Mineral Balances N – P2O5 – K2O at Farm Scale. Method and References. Documento do Projecto GREEN DAIRY - Atlantic Dairy Systems and Environment".
- Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (MADRP), 2001. Portaria N.º 757-A/2001, altera o regulamento de aplicação da intervenção Medidas Agro-Ambientais, aprovado pela Portaria n.º 475/2001, de 10 de Maio. Diário da República N.º 167, I-B Série, 1.º Suplemento, de 20 de Julho de 2001, p. 4490(2)-4490(4).
- Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2002. Boas Práticas Agrícolas Aplicáveis nas Explorações Beneficiárias das Medidas Agro-Ambientais e Indemnizações Compensatórias, DGDR.
- Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2005. Despacho Normativo N.º 33/2005, altera o Despacho Normativo n.º 7/2005, de 1 de Fevereiro, que estabelece os requisitos mínimos para as boas condições agrícolas e ambientais. Diário da República N.º 122, I-B Série, de 28 de Junho de 2005, pp. 4019-4021.
- Ministérios das Finanças e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2002. Portaria N.º 186/2002, actualiza os valores máximos das rendas dos contratos de arrendamento rural. Diário da República N.º 53, I-B Série, de 4 de Março de 2002, pp. 1781-1783.
- Miranda, J., 2000. Contributos para a definição de uma estratégia de intervenção em Zonas de Montanha. In: Cadernos da Montanha - Peneda-Soajo II, pp. 101-107.
- Silva, M., 2000. A Valorização do Gado Bovino na Serra da Peneda: Certificação como Produção Biológica. In: Cadernos da Montanha - Peneda-Soajo II, pp. 43-53.
- U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service, 2006. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. <<http://www.ars.usda.gov>> (1 Março 2007).

## SURVIVAL CAPACITY OF BOVINE SPLIT-EMBRYOS AFTER FREEZING/THAWING

M.R. FARIA, R. METELO, P. SANTOS, A. CHAVEIRO e F. MOREIRA DA SILVA\*

Universidade dos Açores – Departamento de Ciências Agrárias, 9700 Angra do Heroísmo, Portugal, \*jsilva@notes.angra.uac.pt

(Recepção: 24 de Maio de 2007; Aprovação: 17 de Outubro de 2007)

### ABSTRACT

A total of 60 bovine embryos, produced *in vitro*, at the morula/blastocyst stage classified as class I, were divided in 5 groups, with a total of 12 embryos each, to evaluate the survival capacity of embryos/ split-embryos fresh and after freezing/thawing. This way, in group I, the viability of entire fresh embryos was tested, whereas in group II the viability of the half-embryos was tested immediately after bisection. In group III embryos were previously split, being the viability of the half embryos evaluated after frozen/thawing. In group IV embryos were frozen entire, and the bisection performed after thawing, and then evaluated their viability. Finally, in group V the embryos were frozen entire, and then the viability was evaluated after thawing. Embryos were split using a Leitz micromanipulator and the embryos/split-embryos were frozen in 0.25ml straws, using ethylene glycol (1.5 M) and sucrose (0.1 M) as cryoprotectants, and the temperature reduced from -7°C to -35°C at -0.6°C / minute. After being placed in culture, in an incubator, with controlled temperature, humidity and atmosphere, the survival capacity for the embryos/half-embryos was evaluated after 24 and 48 h, using morphological criteria (number of degenerated cells, development to next stage and integrity of cellular mass). At 24 h of culture, no statistical differences were observed among the results obtained for the different groups for the viability which was respectively: 83.3, 75.0, 72.7, 87.5 e 58.3% for groups I, II, III, IV and V. A great loss of viability was observed at 48 h of culture which was: 66.7, 62.5, 59.1, 62.5 e 33.3% for the groups I, II, III, IV e V. No statistical differences were observed at this time among all treatments. On the whole, the results obtained in the present study, allows to recommend that to produce *in vitro* twins conserved for long-term periods, it would be preferable to freeze entire embryos and to bisect them immediately after thawing

**Key-words:** bovine split-embryos, freezing, *in vitro*.

## CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DE HEMI-EMBRIÕES BOVINOS APÓS CONGELAÇÃO/DESCONGELAÇÃO

---

## RESUMO

Um total de 60 embriões de bovino produzidos *in vitro*, no estado de mórula a blastocisto e classificados como classe I, foram divididos em 5 grupos, num total de 12 embriões em cada grupo a fim de estudar a viabilidade *in vitro* dos embriões e hemi-embriões em fresco ou sujeitos a um processo de criopreservação. Desta forma, no grupo I foi testada a viabilidade dos embriões inteiros sem serem sujeitos a congelação. No grupo II foi testada a viabilidade dos hemi-embriões imediatamente após bissecção. No grupo III foi testada a viabilidade dos hemi-embriões os quais sofreram a bissecção e posteriormente foram congelados e descongelados. No grupo IV congelaram-se embriões inteiros tendo a bissecção sido efectuada após a descongelação, e de seguida avaliada a sua viabilidade *in vitro*. Finalmente, no grupo V os embriões foram congelados inteiros, tendo a sua viabilidade sido avaliada após descongelação. A bissecção dos embriões foi feita utilizando dois micromanipuladores Leitz. A congelação dos embriões/hemi-embriões foi feita em palhinhas de 0,25 ml usando etileno glicol (1,5 M) + sacarose (0,1 M) como crioprotectores, tendo a congelação sido feita dos -7 aos -35°C com uma curva de -0,6°C/minuto. Após terem sido postos em cultura *in vitro*, numa estufa de atmosfera, temperatura e humidade controladas, a capacidade de sobrevivência dos embriões/hemi-embriões foi avaliada às 24 e às 48 h recorrendo a critérios morfológicos (número de células degeneradas, desenvolvimento ao estado seguinte e integridade da massa celular). Às 24 h de cultura, observámos que os resultados de desenvolvimento obtidos nos diferentes grupos não apresentaram diferenças significativas, relativamente à taxa de viabilidade, a qual foi respectivamente de 83,3, 75,0, 72,7 e de 87,5% e 58,3% para os grupos I, II, III, IV e V. Uma grande perda de viabilidade foi observada após 48 h de cultura. Observámos que para os grupos I, II, III, IV e V a viabilidade foi respectivamente de 66,7, 62,5, 59,1, 62,5 e 33,3%. No geral, os resultados do presente trabalho permitem recomendar que, para a produção *in vitro* de gémeos bovinos conservados por longos será preferível a congelação dos embriões inteiros, procedendo-se à sua bissecção imediatamente após a descongelação.

**Palavras – chave:** Congelação, hemi-embriões bovinos, *in vitro*.

## INTRODUCTION

One of the main limitations of embryo-transfer is the low number of embryos produced per donor, at each treatment of superovulation. To increase the number of descendants with high genetic potential is splitting the embryos (freshly, or frozen/thawing), producing identical twins, in which one fertilised egg is split and the self-contained halves then develop into two animals with exactly the same genetic information, being transferred to the same receptor, without any risk of freemartinism, characteristic of twin gestation in bovines. The use of identical twins in bovines, in research, dates back to 1930 in Sweden followed by many other countries e.g. New Zealand, England, the United States of America, France, Ireland, and Germany, but the pioneer in embryo splitting to produce identical twins was Willadsen in 1979, working with sheep embryos. Since then, different studies have been

carried out to improve the technique, taking into account the morphological state and quality of the embryo subject to bisection as well as the splitting technique to produce the highest rate of viability for the half-embryos. Actually, embryos are split with a micro-blade or with two glass needles, carefully as the bisection reduces the number of cells to half, retaining therefore enough cells for the normal development of the embryo, unless the other half or both die later.

As far as cryopreservation is concerned, this technique applied to embryos may help to conserve rare species, as well as increasing the commercial boundaries of the embryo market (Rall, 1992; Aller *et al.*, 1995). Some authors (e.g. Heyman, 1985; Suzuki and Shimohira, 1986) postulated that embryos must be split only after freezing/thawing to get a reasonable gestation rate. Later, on 1997, Garcia and collaborators referred that even embryos subject to biopsies for sex determination, couldn't be frozen or produced low results of pregnancy when cryopreserved. Besides in nature, embryos developed in the zona pellucida, Hasler *et al.* (1997) indicate that zona pellucida is not necessary for the mechanical protection of the embryo during freezing. This way, the advantages of embryo cryopreservation, associated with the advantages of splitting embryos, significantly increase the genetic improvement of the livestock when used for the bovine embryo transfer industry (First, 1990).

This study was designed to evaluate the survival capacity of split embryos in the morula/blastocyst stage, which were either previously frozen or frozen after having been bisected. Control experiments were carried out in parallel, to evaluate the viability of the embryos and half-embryos with and without freezing.

## MATERIALS AND METHODS

A total of 60 bovine embryos were used in this study, all in the morula/young blastocyst stage, obtained by *in vitro* fertilisation, from oocytes taken from cows and heifers slaughtered in the abattoir. Embryos were evaluated based on stage of morphological development and quality, and only class I embryos (excellent or good) were taken, in accordance with the criteria proposed by the International Embryo Transfer Society.

After selection, the embryos were divided into five groups, as follow:

Group I: Viability of entire embryos without frozen:

Embryos (n=12) were placed in 60 mm Petri dishes in drops of about 50µl of culture medium covered with mineral oil, to avoid the medium evaporation. Afterwards, they were placed immediately in an incubator saturated in humidity at 38.5°C with 5% CO<sub>2</sub> and after 24 and 48 hours they were examined for stage of development, under a microscope with 50 X magnification.

The evaluation criteria for the survival of the embryos were the ways in which the embryos evolved in status between observations. If the embryos were placed in the morula stage, at the following observation they should be, at least, in the stage of young blastocyst. If they were placed as young blastocyst, they should evolve to blastocyst or hatched-blastocyst.

Group II: Viability of half-embryos without freeze:

Embryos (n=12) were kept in a Petri dish with embryo culture medium, and under an inverted microscope (Wild Leitz GmbH model 090-127,017) they were aseptically split in half, using a micro-blade mounted in a micromanipulator (Leitz-115150). A micropipette was used to keep the embryo in position by suction at the zona pellucida. After splitting, the half-embryos were placed in culture as afore described for Group I and evaluated after 24 and 48 h. Split-embryos, were considered viable if, the content of the cellular mass was intact, with evidence of growth from one observation to the next.

Group III: Freezing of half-embryos after splitting:

In this group, embryos (n=12) were split, and the half-embryos were frozen in ethylene glycol according to (Sommerfeld and Niemann, 1999). Briefly, the half-embryos were balanced for 10 minutes at room temperature in a ViGro™ solution (Minitüb 10086/9033) which comprises ethylene glycol 1.5M and sucrose 0.1M. They were then placed in 0.25ml straws (Minitüb 19041/0010) for successive suction of the following items in order: holding solution (Emcare™ - Holding solution ICP 9012-16) air bubble; ViGro™ solution containing the two half-embryos, air bubble, holding solution. The straws were then placed horizontally at -7°C in a programmable freezer (CL 2000 - HCl Cryogenics.) After 3 minutes of stabilisation (cooling of between 1 and 3°C per minute), seeding was obtained by touching each straw with a metallic clamp cooled in liquid nitrogen. After a platform of 5 minutes at -7°C, the embryos were progressively cooled at a rate of -0.6°C/minute until reaching a temperature of -35°C, where they remained for 10 minutes, and then dipped in liquid nitrogen.

Thawing was carried out by removing the straw from liquid nitrogen, and shaking it, in the air for 5 seconds. The straw was then placed in water at a temperature of 35°C for approximately 10 seconds and the straw's contents, were placed in a Petri dish of 4 individual

---

wells with 1ml of holding solution Emcare™ (Holding solution ICP 9012-16), warmed to 38°C. The half-embryos, together with the freezing medium, were placed in well 1, and then immediately passed to well 2, and then to well 3, where they remained for 5 minutes. The half-embryos were then placed in culture as afore described for “Group I”, and viability was also evaluated after 24 and 48 h.

Group IV: Freezing entire embryos and splitting after thawing:

In this group, embryos (n=12) were frozen and thawed entire, as described for group III. After thawing, they were split as described for Groups II. The half-embryos were then placed in culture, and the viability evaluated after 24 and 48 h.

Group V: Freezing entire embryos without splitting after thawing

In this group, entire embryos (n=12) were frozen and thawed as afore described for the Group III, and placed in culture after thawing, being their viability evaluated after 24 and 48 h.

#### **Statistical procedures:**

The Student's t-test was used to evaluate the differences between groups. ANOVA was used for further analysis, and if there were significant differences, the Fisher's protected significant difference test was used for post hoc analysis. Two-tailed tests were used at all times, and statistical significance was set at  $P < 0.05$ . All analyses were performed using StatView 5.0.1 for Windows® (AbacusConcepts Inc. 3), according to Zar (1996).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

In the present study, the competence for development of fresh/frozen entire/split embryos in the state of morula/blastocyst was evaluated after at 24 and 48 h of culture – hour zero represents the moment in which the embryos were placed in culture.

As it can be observed in Table I, at 24 h of culture, for all treatments, more than 50% of the entire or split embryos showed signs of development. Unfortunately, surely due the low number of structures in each treatment, no statistical differences were found among treatments.

**TABLE I:** SURVIVAL ABILITY EVALUATE AT 24 AND 48 H OF CULTURE. "Y" OR "N" IN THE COLUMNS REPRESENTS EMBRYOS/HALF-EMBRYOS CONSIDERED ALIVE (Y) OR DEAD (N).

Group	Observation at 24 h		Observation at 48 h	
	Y	N	Y	N
Survival				
I (Direct Culture) (embryos = 12)	10 (83.3%)	2 (16.7%)	8 (66.7%)	4 (33.3%)
II (split and Cultivate) (embryos =12)	18 (75.0%)	6 (25%)	15 (62.5%)	9 (37.5%)
III (Cut, Freeze and Cultivate) (embryos =11)	16* (72.7%)	6* (27.3%)	13 (59.1%)	9 (40.9%)
IV (Freeze, Cut and Cultivate) (embryos =12)	21 (87.5%)	3 (12.5%)	15 (62.5%)	9 (37.5%)
V (Freeze and Cultivate) (embryos =12)	7 (58.3%)	5 (41.7%)	4 (33.3%)	8 (66.7%)

\* One embryo was lost.

Our results are in agreement with those published by Hasler *et al.* (1995), in which 93.1% of fresh embryos developed after 24 hours of culture, being, however, considerably higher than the results obtained by Forell *et al.* (2000), in which only 50%, of embryos developed. This disparity of development rates may be related to the embryo selection criteria for the culture. In the present study, only quality I embryos were considered (excellent embryos). If embryos with a slight delay in development or with non-uniform cellular components would be used, it would certainly be observed a reduction in the survival rate. On the other hand, a previous study developed by Costa and collaborators (2000) sowed a direct correlation between developmental stage of the embryos and their ability to develop after freezing. In that study, on the whole, the results showed that embryos better developed gave the best survival rates. As in the present study, embryos developed as morula and blastocysts, were considered together, this difference could not be confirmed.

For group II, in which the embryos were bisected and then placed in the culture, although there was a loss of viability, was observed when compared with the results obtained for group I. In a study carried out previously by Gyu-Jin *et al.* (1998), 91% of the half-embryos were considered viable at 24 h of culture. Despite the results of our study are slightly inferior to those found by Gyu-Jin *et al.* (1998) the latter authors indicated a larger development rate in half-embryos produced from blastocysts, when compared with those produced from morulas (only 40% of them developed). As well as observed for entire embryos by Costa *et al.* (2000), Riedl *et al.* (1996) described a situation in which the development capacity of the embryos used for bisection was directly related to the state of development before the bisection. According to this author, although no differences between the development ability of half-embryos obtained from blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts

were observed, the latter showed a statistically higher rate of development than the young blastocysts and morulas. Regardless of the state of development of the embryos used, this author observed that the developmental capacity of half-embryos obtained from quality I embryos was always higher than those with quality II. In the present study, the low viability of the half-embryos may, among other factors, be due to a larger percentage of morula/young blastocysts than of blastocysts/expanded blastocysts.

Regarding Group III, a loss of viability of 27.3% was observed after 24 h of culture. Gordon (1994) indicates that the reduced viability of the half-embryos which were previously frozen is directly linked with the loss of cells resulting from the cutting process. This author indicates that bisection involves a cell loss of around 9%. One way to minimise the effect of the freezing, when the cryoprotector is in direct contact with the cells, would be to introduce the hemi-embryo into another zona pellucida, which could be obtained from another embryos or even another oocyte. Ozil *et al.* (1982), as well as, Gordon (1994) describe the technique of introducing the hemi-embryo into another zona pellucida before freezing, which could lead to a greater viability of the half-embryos. However, more recent studies carried out by Sotomaru *et al.* (1998), showed that the capacity for survival of half-embryos is identical whether they are introduced into another zona pellucida or not. Haslet *et al.* (1997) postulates that the zona pellucida is not necessary for the mechanical protection of the embryo cells at the time of freezing. Garcia *et al.* (2000) mentioned that after bisection of a total of 12 embryos, 6 were totally expelled from the zona pellucida and then frozen. The embryos were then transferred after thawing, to receptors, and five gestations were observed (41.7%), of which 3 were obtained from embryos frozen without the zona pellucida. These results had already been confirmed by Warfield *et al.* (1987), in which the conclusions of their study showed that the presence of the zona pellucida does not influence the survival capacity of the half-embryos after thawing.

For the group IV, results can be compared as the obtained for group I. After 24 h of culture, only 12.5% of the split embryos did not show signs of development. Bernard and Fuller (1996) stated that bovine embryos tend to become weaker when subjected to freezing/thawing, because during this process the cells are subject to strong physical and chemical changes. Embryos produced *in vitro* have shown themselves to be more sensitive to cooling and to cryopreservation than embryos produced *in vivo* (Hasler *et al.*, 1995; Leibo and Loskutoff, 1993; Pollard and Leibo, 1993; Wurth *et al.*, 1994). Therefore the zona pellucida undergoes structural alterations after thawing, which makes it more flaccid, helping the



cutting procedure, making bisection easier, and allowing for exactly equal halves (50%-50%) and with a minimum or even lack of cell loss, increasing the viability of the half-embryos.

In group V, in which the embryos were frozen and then placed in the culture after having been thawed, without being bisected, we observed a loss of viability in which 7 of the 12 embryos cultivated (58.3%) were considered viable. Fonseca *et al.* (2000), indicate that during thawing, if there has been no destruction of the plasma membranes, the cellular components (lipid vesicles, lysosomal complexes, microtubules and microfilaments) remain unaltered; however, if there is destruction of the plasma membranes, there is a denaturation of cellular components and a consequent viability loss in the cells. Hasler *et al.* (1997) indicated that regardless of freezing, the survival rate of bovine embryos is reduced when these are placed for short periods (10 minutes) in ethylene glycol. After thawing, the loss of viability is due to interactions of factors including the age, development stage and the quality of the embryo, among other factors.

At 48 h of culture, a high reduction in the viability was observed. At this time, for fresh embryos, 8 of the 12 embryos cultivated (66.7%) belonging to group 1, showed signs of developed and 15 of the 24 half embryos (62.5%) belonging to group 2, showed signs of cellular regeneration. This fact may be justified by the different demands of embryos, in accordance with their state of development. Vergos *et al.* (1991) indicated that the demands of embryos in terms of temperature, atmosphere and nutrients are completely different for morulas and for blastocysts. The ability for development, then, depends also on the culture system used. Under the conditions of the present study, regardless of the stage of development, there was no alteration to the environment in which the embryos were cultivated. Furthermore, only embryos which changed from one stage of development to the next stage in the 24 h between observations were considered viable, or in the case of the half-embryos, only the evident signs of cellular regeneration were considered as viability. As known, between the passages from expanded embryo to hatched embryo, in some embryos more than 24 h are required. If this happened, the embryos would not be considered viable. Moreover, after hatching, the *in vitro* environment does not provide the right conditions for development, causing degeneration for most embryos. This is because the hatched blastocysts must be placed on an epithelium column, characteristic of the interior of the uterus at the beginning of gestation for most species, including bovine (Martin and Margot, 2000).

Another aspect which may be noteworthy is the temperature at which the embryos are cultured. Some research teams culture embryos at 37°C (Alfonso and Hunter, 1992) others culture them at 37,5°C (Bavister and, Poole, 2005); 38°C (Johnston *et al.*, 1991) 39°C

---

(Fukui *et al.*, 1996) among others. As well as temperature, other factors such atmosphere, amino acids, glucose, pyruvate, lactate, phosphate and osmotic pressure among others is known to influence the development stage being also different according the development stage of the embryos. At 48 h of culture embryos/half-embryos belonging to the different groups, did not show any statistical differences.

On the whole, the results obtained in the present study, allows to recommend that to produce in vitro twins conserved for long-term periods, it would be preferable to freeze entire embryos and to bisect them immediately after thawing.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work received financial support from FLAD, grant number 379/03.

### REFERENCES

- Alfonso, N.F. and Hunter, A.G., 1992. Effects of temperature (37°C or 39°C) on bovine in vitro fertilization and post-fertilization culture media on subsequent cleavage. *J. Dairy Sci., Sup. 1*, 242:293.
- Aller, J.F., Alberio, R.H., Iovanniti, B. and Cabocevila, J., 1995. Criopreservación de embriones mamíferos. I Parte. Características generales de la congelación. *Rev. Med. Vet.*, 76: 132-136.
- Bavister, B.D. and Poole, K. A., 2005. Duration and temperature of culture medium equilibration affect frequency of blastocyst development. *Reprod Biomed.*, 10(1): 124-129.
- Bernard, A. and Fuller, B.J., 1996. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Hum. Reprod. Update* 2: 193-197.
- Costa, J., Moreira da Silva, J. F. Beckers, J. F. and Delval, A., 2000. Influence of the quality and stage of development of cattle embryos which were produced in vitro and its survival rate after vitrification. *Rev. Port. Zoo.*, 6 (2): 81-90.
- First, N. L., 1990. New animal breeding techniques and their application. *J. Reprod. Fertil., Sup.* 41: 3-14.
- Fukui, Y., Lee, E. S. and N. Araki., 1996. Effect of Medium Renewal During Culture in Two Different Culture Systems on Development to Blastocysts from In Vitro Produced Early Bovine Embryos. *J. Anim. Sci.* 74: 2752–2758.
- Fonseca, J.F., Silva Filho, J.M., Pinto Neto, A., Costa, E.P., Belisário, H., Pardini, W.S. and Alvim, M.T.T., 2000. Cryopreservation of Nelore embryos using 1.8M ethylene glycol and slow cooling rate. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 28: 264-273.

- Forell, F., Lopes, R. and Rodrigues, J., 2000. Viabilidade in vitro de embriões bovinos produzidos in vitro e biópsiados por microspiração. *Arq. Fac. Med. Vet. Porto Alegre*, 28: 266.
- Garcia, J. F., Nogueira, M. F. G. and Pupim, F., 1997. Pregnancy rates of blastomere biopsied bovine embryos frozen in ethylene glycol. *Theriogenology*, 47: 268-268.
- Gordon, I., 1994. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford UK. CAB International.
- Gyu-Jin, R., Johnson, W. and Betteridge, K., 1998. Cellular composition and viability of demi- and quarter- embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 50: 885-895.
- Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Nelly, B., Shuey, L.S., Stokes, J.E. and Trimmer, S.A., 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43: 141-152.
- Hasler, J.F., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q. and Stokes, J.E., 1997. Survival of IVF- derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology*, 48: 563-579.
- Heyman, Y., 1985. Factors affecting the survival of transferred whole and half-embryos in cattle. *Theriogenology*, 23: 63-75.
- Johnston, L. A., Donoghue, A. M., O'Brien, S. J. and De Wildt., 1991. Influence of temperature and gas atmosphere on in-vitro fertilization and embryo development in domestic cats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92: 377-382.
- Leibo, S.P. and Loskutoff, N.M., 1993. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39:81-94.
- Martin, H.J. and Margot, L. D., 2000. Egg timers: how is developmental time measured in the early vertebrate embryo? *BioEssays*, 22: 57-63.
- Ozil, J.P., Heyman, Y. and Renard, J.P., 1982. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Rec.*, 110: 126-127.
- Pollard, J.W. and Leibo, S.P., 1993. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39:287 (abstract).
- Rall, W.F., 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Theriogenology*, 28: 237-245.
- Riedl, J., Zakhartchenko, V. and Wolf, E., 1996. Effect of embryo developmental stage and quality on the efficiency of in vitro produced bovine embryo splitting. *Theriogenology*, 45:221 (abstract).
- Sommerfeld, V. and Niemann, H., 1999. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 38: 95-105.
- Sotomaru, Y., Kato, Y. and Tsunoda, Y., 1998. Production of monozygotic after freezing and thawing of bisected mouse embryos. *Cryobiology*, 37: 139-145.
- Suzuki, T. and Shimohira, I., 1986. Viability of frozen-thawed embryos bisected in sucrose: A preliminary report. *Theriogenology*, 26: 333-339.
- Vergos, E., Kinis, A., Lonergan, P., Sherif, H., Gallagher, M. and Gordon, I., 1991. The effect of culture system on the in vitro development of bovine oocyte matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 35:290 (abstract).
- Warfield, S.J., Seidel, G.E. and Jr Elsdon, R.P., 1987. Transfer of bovine demi-embryos with and without the zona pellucida. *J. Anim. Sci.*, 65: 756-761.
-

- Willadsen, S.M., 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277: 298-300.
- Wurth, Y.A., Reinders, J.M.C., Rall, W.F. and Kruip, T.H., 1994. Developmental potential of in vitro produced bovine embryos following cryopreservation and single embryo transfer. *Theriogenology*, 42: 1275-1284.
- Zar, J.K., 1996. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall International, 662p.

---

## MYCOBIOTA CHARACTERISATION IN CORN

I. ALMEIDA<sup>1</sup>, E. TORRADO<sup>2</sup>, M.F. MARQUES<sup>2</sup> e H. M. MARTINS<sup>2</sup>

1 Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Departamento de Medicina Veterinária – Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal, e-mail: inesfma@hotmail.com; 2 INRB, IP - LNIV – Serviço de Micologia, Estrada de Benfica 701,1549-011 Lisboa, Portugal, e-mail: coimbra.mm@gmail.com; ema.torrado@gmail.com; marina.martins@lniv.min-agricultura.pt

(Recepção: 10 de Setembro de 2007; Aprovação: 15 de Novembro de 2007)

### ABSTRACT

Cereals are the major component of animal feed. Frequently, this raw material is contaminated with fungal agents. Such contaminations contribute for the negative variation on the organoleptic and hygienic parameters like those due to lost of essential nutrients, abnormal sensorial characteristics and even presence of toxic substances. The aim of this study was to characterise the type and extension of this contaminations. Thirty seven samples of corn (N=37) were collected and analysed. All samples showed mycological contamination (n+=37) and the mycological level mean was  $7.3 \times 10^3$  cfu/g ranging from  $7.5 \times 10^1$  cfu /g to  $3.8 \times 10^4$  cfu/g. Yeasts were found in 97.5% of the contaminated samples (M= $3.8 \times 10^4$  cfu/g). The most prevalent moulds belong to *Fusarium* (86.5%,  $4.5 \log_{10}$  cfu/g) and *Penicillium* (67.6%,  $4.3 \log_{10}$  cfu/g) genera and to *A. flavus* (62.2%,  $4.0 \log_{10}$  cfu/g). It was also found, with a lower prevalence, fungi of *Mucor* genera (43.2%), *A. glaucus* (43,2%) and *A. candidus* (40.5%). High frequencies and levels of fungi of the *Fusarium* genera can be relevant as indicative of the presence of the common toxins associated with these agents (T-2 and HT-2 toxins, deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone toxins).

**Key-words:** contaminations, *Fusarium* spp., raw-materials, yeasts.

## CARACTERIZAÇÃO DO MICOBIOTA DE MILHO EM GRÃO

### RESUMO

Os cereais são as principais matérias-primas da indústria de fabrico de alimentos para animais de produção. Frequentemente são contaminados por agentes fúngicos capazes de alterar as respectivas características organolépticas e sanitárias: devido à perda de nutrientes essenciais, ao aparecimento de características sensoriais anormais e de substâncias tóxicas que podem afectar a saúde dos animais. O objectivo deste trabalho foi caracterizar a extensão e a natureza das contaminações em amostras de milho e verificar quais as espécies fúngicas

---

mais frequentes. Efectuaram-se 37 análises micológicas a amostras de milho em grão (n = 37), para caracterizar a natureza das contaminações fúngicas. Todas as amostras revelaram contaminações (n+ = 37). O teor micológico médio (M) foi  $7,3 \times 10^3$  ufc/g ( $3,9 \log_{10}$  ufc/g), oscilando entre  $7,5 \times 10^1$ /g ( $1,9 \log_{10}$  ufc/g) e  $3,8 \times 10^4$ /g ( $4,6 \log_{10}$  ufc/g). Foram encontradas leveduras em 97,3% das amostras positivas (M=  $3,8 \times 10^4$ /g) ( $4,6 \log_{10}$  ufc/g). Os bolores de maior prevalência pertenciam ao género *Fusarium* (86,5%) ( $4,5 \log_{10}$  ufc/g), *Penicillium* (67,6%) ( $4,3 \log_{10}$  ufc/g) e *A.flavus* (62,2%) ( $4,0 \log_{10}$  ufc/g). Foram encontrados também, mas com menor prevalência, fungos do género *Mucor* (43,2%), *A.glaucus* (43,2%) e *A.candidus* (40,5%). A elevada frequência do género *Fusarium* e respectivo teor nalgumas amostras, podem ser indicadores de usuais contaminações por toxinas associadas a este género (toxinas T-2 e HT-2, deoxivalenol, fumosinas, zearalenona).

**Palavras-chave:** contaminações, *Fusarium* spp., leveduras, matérias-primas.

## INTRODUÇÃO

As contaminações mais comuns dos alimentos têm origem em agentes biológicos, com especial relevância para as bactérias patogénicas e suas toxinas (Sá, 2002). Para além das bactérias, outros grupos de organismos, tais como vírus (e.g. Rotavírus, Astrovírus, vírus Norwalk), parasitas (e.g. *Trichinella* spp., *Taenia solium*) e fungos (e.g. *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp.), podem contaminar os alimentos. Dos organismos mencionados, destacam-se estes últimos como contaminantes omnipresentes nos produtos alimentares de origem vegetal, frescos desidratados ou fermentados (e.g. cereais, sementes de oleaginosas, ensilagens). O desenvolvimento destes organismos nas matrizes naturais não é de todo desejável uma vez que consomem nutrientes essenciais tais como, lípidos, proteínas, vitaminas e glúcidos, comprometendo o valor nutricional dos alimentos. Em condições ecológicas favoráveis, os fungos podem ainda sintetizar metabolitos secundários tóxicos, denominados micotoxinas (Basto, 2002). Estas decomposições têm evidentes impactos económicos e sanitários, não só pelas perdas directas e indirectas que ocasionam, mas também pelo custo das medidas preventivas e dos tratamentos necessários para impedir a respectiva ocorrência (boas práticas agrícolas, secagem, desinfestação e tratamentos químicos: fungicidas e fungistáticos) (Bernardo, 2004; Martins *et al.*, 2004).

Neste contexto a Micologia Alimentar é uma área relevante que tem por objectivo o estudo das condições que determinam a deterioração de alimentos pelos fungos, sendo por isso fundamental no aumento da segurança e qualidade sanitária dos produtos alimentares (Dilip *et al.*, 1991; Dias, 1999). Em matéria de alimentação animal, as micotoxinas constituem um problema real em todo o mundo, uma vez que se pode considerar sempre presente a contaminação fúngica de grãos de cereais e oleaginosas, bem como de outras matérias-primas utilizadas em grandes quantidades na formulação de alimentos compostos para animais. Esta

realidade, causa graves prejuízos económicos aos produtores pecuários, uma vez que as micotoxinas afectam o bem-estar dos animais, reduzem a produtividade e podem mesmo, em situações extremas, causar a morte (Smith *et al.*, 1995; Gouveia, 2004). Os processos de degradação de micotoxinas não são ainda inteiramente satisfatórios, sobretudo porque existe uma grande variedade de metabolitos que apresentam comportamentos químicos diversos, dificultando a implementação de procedimentos de degradação.

É fundamental a adopção de medidas preventivas que reduzam ou inibam os fungos toxigénicos nos alimentos, tais como, o desenvolvimento de tecnologia de produção e armazenamento dos produtos alimentares, o controlo e a identificação do micobiota contaminante e das suas características fisiológicas, de forma a anular o seu poder de invasão (Quinta, 1978; Basto, 2002). Dado que é quase impossível impedir a contaminação dos alimentos por fungos toxigénicos, é essencial a implementação de rotinas para controlo micológico e detecção de micotoxinas junto dos produtores agrícolas e dos industriais do sector alimentar.

O milho é uma importante matéria-prima da indústria dos alimentos compostos com elevada taxa de incorporação nestes alimentos. Nos últimos anos esta matéria-prima tem vindo a ser utilizada como fonte para produção de biodiesel, competindo esta actividade com a do fabrico de rações na utilização de milhos. O milho é um cereal que apresenta, dada as suas características nutritivas, uma grande predisposição à contaminação. Assim, é de extrema importância a monitorização das características do micobiota contaminante, como forma de controlar as alterações de qualidade e mesmo toxicológica das rações para animais. É importante salientar que a prevenção directa da saúde dos animais, corresponde indirectamente a prevenção da própria saúde do homem, que se alimenta dos produtos de origem animal.

Com este trabalho procura-se fornecer elementos relevantes para o controlo micológico de matérias-primas, o conhecimento dos fungos contaminantes destes produtos, e demonstrar a extrema importância desta prática laboratorial como forma de controlar a contaminação fúngica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostragem**

Foram analisadas 37 amostras de milho em grão. As amostras utilizadas foram obtidas de várias fábricas de alimentos compostos para animais de diferentes pontos do país. As

amostras foram colhidas assepticamente, acondicionadas em sacos plásticos e enviadas ao laboratório, à temperatura ambiente, por particulares e por técnicos oficiais responsáveis por colheitas de amostras para controlo oficial.

### **Preparação das suspensões e dos inóculos**

Utilizou-se como soluto de suspensão de Triptona-Sal (Ref: Triptona 211707 BD Diagnostics; Cloreto de sódio Ref 6004-Merck). Pesaram-se 10g de amostra para um balão “Erlenmeyer” esterilizado com os devidos cuidados de assépsia e adicionou-se 90 ml do soluto de suspensão. Agitou-se a mistura durante aproximadamente 5 minutos, num agitador de braços. Posteriormente a mistura foi colocada em repouso durante 10 minutos. Procedeu-se a diluições decimais a partir da suspensão-mãe. Retirou-se 1ml de inóculo do tubo com a suspensão-mãe e distribuiu-se 0,25 ml por cada uma das 4 placas de Petri contendo o meio de cultura CRBA (Ref: 270310-BD Diagnostics), suplementado com a solução de oxitetraciclina na concentração de 3,5 mg/dm<sup>3</sup> (Ref: SR00073 A-Oxoid). A inoculação da suspensão-mãe e das diluições deve ser efectuada no menor espaço de tempo possível. Após inoculação as placas foram colocadas em posição invertida e foram incubadas a 25°C durante 5-7 dias em atmosfera húmida.

### **Contagem de colónias e identificação de bolores**

Concluída a incubação procedeu-se à leitura os resultados. A contagem de colónias foi efectuada nas 4 placas/ suspensão da diluição mais alta, cujo número de colónias, por placa, seja inferior a 150 (Projecto NP-3277-2; 2002). As colónias de bolores e leveduras são agrupadas separadamente de acordo com a sua morfologia macroscópica.

Efectuou-se a determinação dos teores totais e médios da contaminação micológica, procedendo-se à identificação parcial de géneros e espécies de fungos filamentosos.

A identificação de bolores foi efectuada através das características morfológicas macroscópicas e microscópicas (lupa estereoscópico e microscópio óptico). Para observação das estruturas morfológicas necessárias à identificação de bolores, fizeram-se preparações frescas cujo líquido de montagem foi o Azul de Lactofenol em solução (Ref: Merck; art. 1.13741.0100). Para identificar os bolores recorreu-se a chaves dicotómicas de identificação: *Moreau, 1968*, *Domsch et al, 1980*; *Barnett e Hunter, 1987* e utilizaram-se diferentes geloses. *Czapek yeast extract agar* (CYA) e *Malt extract agar* (MEA) para *Aspergillus* e *Penicillium* e *Potato dextrose agar* (PDA), para espécies de *Fusarium* (Samson and Pitt, 1990) .



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 37 amostras de milho em grão apresentaram contaminações fúngicas (100%) (Quadro I). Verificou-se que os bolores predominantes pertenciam aos géneros *Fusarium* (86,5%), *Penicillium* (67,6%) e à espécie *A.flavus* (62,2%). O teor micológico médio (M) do conjunto das amostras foi  $7,3 \times 10^3$  ufc/g. Das amostras analisadas, 45,9% apresentaram teores micológicos totais (TMT) inferiores a  $1,5 \times 10^4$  ufc/g; 16,3% do total de amostras apresentaram uma contaminação fúngica entre  $1,5 \times 10^4$  ufc/g e  $3,0 \times 10^4$  ufc/g; e 37,8% das amostras apresentaram teores totais superiores a  $3,0 \times 10^4$  ufc/g.

Os resultados obtidos nesta caracterização, embora pouco significativos, face à dimensão da amostra, são semelhantes a outros referidos por vários autores que têm publicados trabalhos semelhantes sobre o grão de milho armazenado. Também têm sido identificados os géneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* como os principais contaminantes deste cereal (Bullerman et al., 1975; Martins, 1987; Martins e Martins, 2001). No entanto, o teor médio obtido é superior à dos obtidos por outros autores o que nos leva a concluir que esta matéria-prima encontra-se bastante contaminada. O Quadro 2 refere os teores médios dos vários géneros e espécies fúngicas contaminantes das amostras de milho em grão analisadas.

**QUADRO I** – OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM MILHO EM GRÃO PARA ALIMENTAÇÃO ANIMAL.

n+/N	Teor Médio	Min - Máx
37/37	$7,3 \times 10^3$ ucf/g	$7,5 \times 10^1 - 3,8 \times 10^4$ ufc/g

Embora menos frequentes também foram observados bolores dos géneros *Mucor* (43,2%), *A.glaucus* (43,2%) e *A.candidus* (40,5%). Foram encontradas leveduras em 97,3% das amostras com um teor médio que se cifrou em  $3,8 \times 10^4$  /g. Na Fig. 1 indicam-se as respectivas frequências dos diferentes géneros e espécies fúngicas contaminantes das amostras de milho em grão. A maioria das amostras apresentou uma flora fúngica diversificada, embora noutras tenha sido observado predomínio de géneros potencialmente toxigénicos como *Fusarium* e *Aspergillus*. Um micobiota diversificado é normalmente resultante de uma contaminação ao nível do campo, mesmo antes da colheita do cereal. Já no caso em que regista uma clara predominância de um determinado género ou espécie indica que os fungos se desenvolvem numa das fases de cadeia comercial ou numa das etapas do processamento (condições de armazenamento deficientes, com excesso de humidade).

QUADRO II- MÉDIA DO TEOR MICOLÓGICO DE ALGUNS GRUPOS DE FUNGOS DETECTADOS (ufc /G E LOG<sub>10</sub>)

Fungos	Teor médio (ufc/g)	Teor médio (log <sub>10</sub> ufc/g)
Leveduras	3,8 x 10 <sup>4</sup>	4,6
Asp. flavus	1,0 x 10 <sup>4</sup>	4,0
Asp. fumigatus	1,1 x 10 <sup>3</sup>	3,0
Asp. niger	1,0 x 10 <sup>3</sup>	3,0
Asp. terreus	6,7 x 10 <sup>3</sup>	3,8
Asp. candidus	1,0 x 10 <sup>4</sup>	4,0
Asp. glaucus	1,7 x 10 <sup>4</sup>	4,2
Asp. flavipes	6,4 x 10 <sup>2</sup>	2,8
Asp. ochraceus	7,5 x 10 <sup>1</sup>	1,9
Asp. versicolor	3,6 x 10 <sup>2</sup>	2,6
Acremonium spp.	2,4 x 10 <sup>3</sup>	3,4
Cladosporium spp.	6,7 x 10 <sup>3</sup>	3,8
Penicillium spp.	2,1 x 10 <sup>4</sup>	4,3
Mucor spp.	8,8 x 10 <sup>2</sup>	2,9
Trichoderma spp.	4,8 x 10 <sup>1</sup>	1,7
Fusarium spp.	3,5 x 10 <sup>4</sup>	4,5
Rhizopus spp.	2,1 x 10 <sup>2</sup>	2,3
Absidia spp.	1,5 x 10 <sup>3</sup>	3,2
Scopulariopsis spp.	8,1 x 10 <sup>2</sup>	2,9
Verticillium spp.	1,1 x 10 <sup>3</sup>	3,0
Alternaria spp.	1,0 x 10 <sup>2</sup>	2,0
Teor médio	7,3 x 10 <sup>3</sup>	3,9

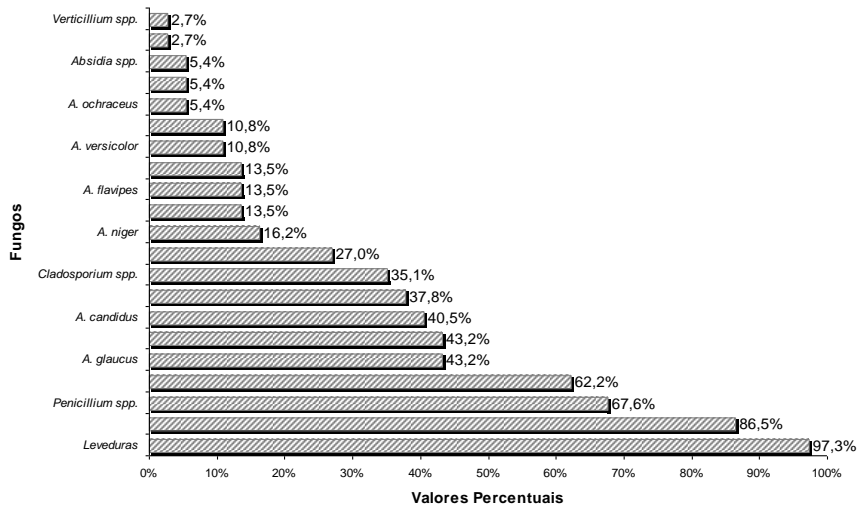


Figura 1 - Frequência dos diferentes gêneros e espécies fúngicas.

Quando a análise micológica de matérias-primas denuncia contaminações fúngicas muito elevadas ( $>7 \log_{10}$  ufc/g) principalmente por géneros de bolores potencialmente toxigénicos, é aconselhável quantificar os níveis de micotoxinas e, consoante o resultado, ponderar a sua utilização no fabrico e alimentos compostos. É importante considerar vários factores, tais como: tipo de micotoxinas detectado; índices de contaminação; percentagem de incorporação da matéria-prima no alimento composto; perfil zootécnico do animal a que o alimento se destina (*e.g.* espécie animal, idade, sexo, estado nutricional e condição de saúde).

Deve ter-se ainda em atenção que a contaminação micológica pode estar “mascarada” com a utilização de produtos antifúngicos ou pelos tratamentos tecnológicos (aquecimento). Este facto leva a que o conhecimento do micobiota do produto não traduza a contaminação micotoxicológica das matérias-primas e produto acabado. Por outro lado, quando a contaminação micológica é muito elevada, a identificação do micobiota permite orientar para a natureza de micotoxinas a pesquisar.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com estas análises permitem concluir que, embora considerando o universo das nossas amostras, o milho em grão apresenta em regra uma elevada carga fúngica associada. Caso esta matriz não seja submetida a tratamento tecnológico capaz de reduzir as contaminações, poderão dar origem a produtos finais contaminados, potencialmente tóxicos. O estabelecimento de limites de contaminação fúngica dos alimentos é uma ferramenta útil, permitindo para a indústria uma melhor avaliação da respectiva qualidade.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a pronta colaboração prestada pelos Técnicos Profissionais, Anabela Ramos e Cândida Camejo.

## BIBLIOGRAFIA

Barnett, H.L. and Hunter, B.B., 1987. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. MacMillan Publ. Co., New York.

---

- Basto, A.I., 2002. Desenvolvimento de um método de cromatografia líquida de alta eficácia para determinação da toxina T-2 em cereais. Dissertação de Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Bernardo, F., 2004. Micotoxinoses: Gestão de Risco. Prova de agregação. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa.
- Bernardo, F.M.A., 2002. Avaliação dos riscos biológicos de origem alimentar. Palestra proferida no seminário “Qualidade e Segurança Alimentar”. Instituto Superior de Agronomia, 20 e 21 de Maio, pp.15-29.
- Bullerman, L.B., Baça, J.M. and Scott, W.T., 1975. An evaluation of potencial mycotoxin – producing molds in corn meal. *Cereal Food World*.
- Dias, M.I., 1999. Micologia e Micotoxicologia Veterinárias. Relatório de Estágio de Licenciatura, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Dilip K., Arora, K.G., Mukerji & Elmer and Marth, H., 1991. *Handbook of Applied Mycology. Foods and Feeds*. Edited New York, USA.
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H., 1980. *Compendium of Soil Fungi, Vol.1*, Academic Press, London.
- Gouveia, M.F., 2004. Controlo e Qualidade Micológica em Matérias-Primas e Alimentos Compostos para Animais. Relatório de Estágio da Licenciatura em Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Martins, H.M., 1987. Relatório de Actividades. Tese de Acesso à categoria de Assistente de Investigação, Ed. LNIV, Lisboa, pp. 27-29.
- Martins, H.M., Guerra, M.M. e Bernardo, E.F., 2004. Fungos e Micotoxinas em Alimentos Compostos para Suínos na Última Década em Portugal (1995/2004). *Revista da Sociedade Científica de Suinicultura*, pp. 6-12.
- Martins, M.L. e Martins, H.M., 2001. Mycoflora and mycotoxins incidence in raw material (1996 - 2000). Congresso Nacional de Microbiologia – Micro 2001, Póvoa do Varzim, Portugal.
- Moreau, C., 1968. Moisissures toxiques dans l’alimentation, Lechevalier, P. (ed.), Paris.
- PIÇARRA, J., 2001. Organismos geneticamente modificados: uma perspectiva da indústria de alimentos compostos para animais. (<http://www.agroportal.pt/a/2001/jpicarra.htm>).
- Projecto de Norma Portuguesa (prNO 3277-2, 2002). Microbiologia alimentar: Regras Gerais para a contagem de bolores e leveduras a 25°C. Parte 2: Método de referência.
- Quinta, L.M., 1978. Aspecto micológico do controlo de qualidade dos alimentos compostos e respectivas matérias-primas. *Ver. Port. Ciênc. Vet.*, Vol LXXIII nº 447/48, Jul./Dez., pp. 101-126.
- Sá, M.I.C., 2002. Zoonoses – aspectos particulares em segurança alimentar. Palestra proferida no Seminário “Qualidade e Segurança Alimentar”. Instituto Superior de Agronomia, 20 e 21 de Maio, pp. 68-82.
- Samson, R.A. and Pitt, J.I., 1990. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification, Ed. By Robert A. Samson and John I. Pitt, Plenum Press, USA, pp. 478
-

- Smith, J.E., 2001. Mycotoxins. In: Food Chemical Safety, Vol.1 (Watson, D.H., eds), CRC Press, Boca Raton, pp. 238-259.
- Smith, J.E., Solomons, G., Lewis, C. and Anderson, J.G., 1995. The role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. *Nat. Toxins*, pp. 187-192.
- Soares, M.C., 2002. Riscos Alimentares e Medos Humanos. Coleção Veterinária XXI, Nº 4. Publicações Ciência e Vida, Lda., Lisboa.