

# ÍNDICE

EFEITO DO REGIME DE ALEITAMENTO SOBRE A DURAÇÃO DO PERÍODO DE ANESTRO PÓS-PARTO EM CABRAS DA RAÇA SERRANA – ECÓTIPO TRANSMONTANO – PARIDAS NO OUTONO T. M. CORREIA, R. C. VALENTIM, J. AZEVEDO, J. C. ALMEIDA, L. GALVÃO, A. MENDONÇA, M. CARVALHO e P. FONTES .....	1
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DO EPITÉLIO BRANQUIAL DE PEIXES TELEÓSTEOS S.M. MONTEIRO, A. FONTAÍNHAS-FERNANDES e M. SOUSA .....	13
EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE FAVA ( <i>VICIA FABA</i> ), DE TREMOÇO ( <i>LUPINUS ALBUS</i> ) OU DE FEIJÃO FRADE ( <i>VIGNA UNGUICULATA</i> ) NA ALIMENTAÇÃO DO LEITÃO SOBRE O BALANÇO AZOTADO E A ACTIVIDADE DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DO PÂNCREAS J. A. PEREIRA, e J. P. BENGALA-FREIRE.....	37
IMPROVING COW COMFORT THROUGH APPROPRIATE STALL, FLOORING AND COOLING SYSTEMS DESIGN J. R. BICUDO .....	49
EXTENSIVE LIVESTOCK PRODUCTION AND ENVIRONMENT BEEF CATTLE EXTENSIVE SYSTEM – TRADITION AND INNOVATION C. J. REIS ROQUETE .....	69
<i>IN VIVO</i> AND <i>IN VITRO</i> TECHNIQUES TO ESTIMATE FERMENTATION AND DIGESTION IN RUMINANTS J.W. CONE .....	89

## EFFECT OF REARING REGIME ON *POSTPARTUM* ANOVULATORY PERIOD ON SERRANA GOATS – ECOTYPE TRANSMONTANO – KIDDED AT FALL

T. M. CORREIA<sup>1</sup>, R. C. VALENTIM<sup>1</sup>, J. AZEVEDO<sup>2</sup>, J. C. ALMEIDA<sup>2</sup>, L. GALVÃO<sup>1</sup>, A. MENDONÇA<sup>1</sup>, M. CARVALHO<sup>1</sup> e P. FONTES<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior Agrária de Bragança, Dept. de Zootecnia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, [tcorreia@ipb.pt](mailto:tcorreia@ipb.pt). <sup>2</sup>Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Dept. de Zootecnia, Apartado 1013, 5001-911 Vila Real, Portugal

*(Aceite para publicação em 28 de Janeiro de 2004)*

### ABSTRACT

The main aim of this paper was to study the effect of two different rearing regimes (permanent rearing vs. “nocturnal” rearing + daily milking) on *postpartum* anoestrus on Portuguese Serrana goats, ecotype Transmontano, kidded at fall. Present study was performed in Bragança (latitude 41° 49' N, longitude 6° 40' W and altitude 720 meters), at the Agrarian Superior School farm of Sta Apolónia. Twenty-four adult (4-5 years old) Serrana goats were selected for this study. Mean interval between kidding and first *postpartum* increase in plasmatic concentration of progesterone ( $P > 0.5$  ng/ml) was of  $54.0 \pm 12.4$  days. About 58.7% of the Serrana goats presented a “short” first luteal phase while the other 41.3% presented a “normal” one. Mean interval between kidding and first *postpartum* heat was of  $56.3 \pm 18.7$  days. Serrana goats return to sexual activity did not vary significantly according to rearing regime.

**Key words:** goats, *postpartum* anoestrus, rearing regime

## EFEITO DO REGIME DE ALEITAMENTO SOBRE A DURAÇÃO DO PERÍODO DE ANESTRO PÓS-PARTO EM CABRAS DA RAÇA SERRANA – ECÓTIPO TRANSMONTANO – PARIDAS NO OUTONO

### RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objectivo de estudar o efeito da aplicação de dois regimes diferentes de aleitamento (amamentação vs. amamentação “nocturna” + ordenha) sobre a duração do período de anestro pós-parto, em cabras da raça Serrana, ecótipo Transmontano, paridas no final do Outono. Na cidade de Bragança (latitude 41° 49' N, longitude 6° 40' W e altitude 720 metros), mais precisamente na Quinta de Santa Apolónia, pertencente à Escola Superior Agrária de Bragança, um

grupo de 24 cabras da raça Serrana, ecótipo Transmontano, com 4 a 5 anos de idade, foi escolhido para a realização deste estudo. A duração do intervalo médio de dias observados entre o parto e a primeira subida das concentrações plasmáticas de progesterona pós-parto ( $P > 0,5 \text{ ng/ml}$ ) foi de  $54,0 \pm 12,4$  (40-95 dias). A duração da primeira fase lútea pós-parto foi curta em 58,3% das cabras e normal nas restantes 41,7%. A duração do intervalo médio de dias registados entre o parto e o 1º cio pós-parto foi de  $56,3 \pm 18,7$ . A retoma da actividade sexual pós-parto não variou significativamente em função do regime de aleitamento utilizado.

**Palavras-chave:** anestro pós-parto, caprinos, regime de aleitamento

## INTRODUÇÃO

A retoma da actividade sexual pós-parto depende de vários factores, dos quais gostaríamos aqui de destacar: a estação do ano (Bocquier *et al.*, 1993; Gonzalez Lopez, 1993; Delgadillo *et al.*, 1998), a lactação (Short *et al.*, 1990; Gonzalez Lopez, 1993) e o regime de aleitamento (Short *et al.*, 1990; Delgadillo *et al.*, 1998; Gordon, 1999). A acção destes factores sobre o reinício da actividade sexual pós-parto das cabras Serranas é ainda pouco conhecida, apesar dos trabalhos realizados por Mascaranhas *et al.* (1995), Fonseca (1998), Correia *et al.* (2001) e Azevedo *et al.* (2002). De acordo com Mascaranhas *et al.* (1995), a duração do período de anestro pós-parto das cabras Serranas, ecótipo Ribatejano, depende claramente da estação do ano em que o parto ocorre. Por seu turno, os resultados encontrados por Correia *et al.* (2001) e Azevedo *et al.* (2002) parecem igualmente indicar uma forte influência da sazonalidade sobre o regresso à actividade sexual pós-parto das cabras Serranas, ecótipo Transmontano. Contudo, ao que sabemos, os efeitos da lactação e/ou do regime de aleitamento sobre a retoma da actividade sexual pós-parto das cabras Serranas, ecótipo Transmontano, permanecem totalmente desconhecidos.

Este ensaio teve com principal objectivo estudar o efeito da aplicação de dois regimes alternativos de aleitamento sobre a duração do período de anestro pós-parto, em cabras da raça Serrana, ecótipo Transmontano, paridas no final do Outono.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na cidade de Bragança (latitude  $41^\circ 49' \text{ N}$ , longitude  $6^\circ 40' \text{ W}$  e altitude 720 m), mais precisamente na Quinta de Santa Apolónia, pertencente à Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB), entre 29 de Novembro de 2001 e 15 Março de 2002.

## Animais

Um grupo de 24 cabras adultas (4-5 anos) da raça Serrana, ecótipo Transmontano, todas elas cobertas por monta natural (sem terem sido submetidas a qualquer tratamento hormonal) e que pariram sem qualquer problema (entre 29 de Novembro e 6 de Dezembro de 2001), foi utilizado na realização deste trabalho. A percentagem de cabras que pariram uma só cria (70,8%) revelou-se estatisticamente superior à percentagem de cabras que pariram duas crias (29,2%) ( $\chi^2=35,280$ ;  $P\leq 0,001$ ). Por outro lado, estas cabras pariram mais fêmeas (64,5%) do que machos (35,5%) ( $\chi^2=15,680$ ;  $P\leq 0,001$ ).

Todas as cabras foram alimentadas *ad libitum* com feno de prados naturais e entre 350-400 g/dia de alimento concentrado comercial. A alimentação destas fêmeas foi sempre feita em grupo.

## Regime de aleitamento

Uma semana após o parto, as cabras e respectivos cabritos foram aleatoriamente divididos em dois grupos:

**Amamentação** (n = 10) – Os cabritos foram deixados em contacto permanente com as respectivas mães.

**Amamentação “nocturna” + Ordenha** (n = 14) – Os cabritos foram diariamente separados das respectivas mães, apenas podendo contactar com estas durante o período “nocturno” do dia (das 16:30 às 8:30 h). Imediatamente antes da junção, as cabras foram diariamente ordenhadas.

## Determinação do peso corporal

Pouco tempo após a expulsão das placentas, as cabras foram pesadas numa balança com jaula (sensibilidade mínima de 100 g). Posteriormente, as pesagens foram feitas semanalmente.

## Determinação do estado fisiológico

Após o parto, com o intuito de estudar a actividade ovárica das cabras, foi feita, duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras), pela manhã, uma recolha de sangue, com o auxílio de tubos de ensaio vacuonizados e heparinizados, através da punção da veia jugular. Após a centrifugação do sangue, a 3.000 r.p.m., durante 15 minutos, procedeu-se à separação do sobrenadante, ou seja, do plasma sanguíneo. A técnica de RIA utilizada na determinação dos níveis plasmáticos de progesterona foi a indicada pelo fabricante dos kits (*Diagnostic Products Corporation*). Os coeficientes médios de variação inter e intra-ensaio foram, respectivamente, de 9,8 e 6,2%.

A recolha das amostras de sangue começou a ser feita, no máximo, 4 dias após o parto. Considerou-se que as cabras se encontravam em anestro, até ao momento em que os níveis plasmáticos de progesterona se elevaram, pela primeira vez, acima dos 0,5 ng/ml (PSCPP).

As fases lúteas foram consideradas de duração curta, normal ou persistente, consoante os níveis plasmáticos de progesterona se mantiveram elevados durante 3-12 dias, 13-18 dias ou >18 dias, respectivamente (adaptado de Corteel, 1972).

### **Deteção dosaios**

Antes de parirem, as cabras foram alojadas num recinto contíguo a outro, no qual estavam alojados três bodes inteiros; a dividi-los estava apenas uma cerca de rede.

Com o intuito de se proceder à identificação das cabras em cio, equiparam-se dois bodes vasectomizados (através da ablação de uma pequena porção do canal deferente) com arneses marcadores. A identificação das marcações foi feita duas vezes por dia (logo pela manhã e ao fim da tarde). Os bodes permaneceram junto das cabras durante todo o ensaio.

### **Análise estatística**

Com o objectivo de identificar diferenças estatisticamente significativas entre alguns parâmetros efectuaram-se análises de variância, segundo o teste de Bonferroni/Dunn (Dunn, 1961). Com o intuito de se estabelecerem relações entre alguns parâmetros foram feitas análises de correlação e regressão (Steel e Torrie, 1980). Com a finalidade de se compararem frequências utilizou-se o teste de  $\chi^2$  (Snedecor e Cochran, 1980). Os dados foram expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Imediatamente após o parto, as cabras estudadas apresentavam um peso corporal médio de  $42,3 \pm 5,6$  kg (c.v. = 13,2%). Nesse momento, as cabras que pariram duas crias eram mais pesadas do que as que pariram somente uma ( $P \leq 0,01$ ) (Quadro I).

Quando da PSCPP, as cabras Serranas pesavam, em média,  $39,8 \pm 5,2$  kg (c.v. = 13,1%). O regime de aleitamento praticado não influenciou significativamente o peso corporal à PSCPP ( $P > 0,05$ ). Nesta altura, as cabras que amamentavam duas crias eram igualmente mais pesadas do que as que amamentavam apenas uma ( $P \leq 0,05$ ) (Quadro I). Entre o parto e a PSCPP, as cabras perderam, em média,  $2,5 \pm 1,6$  kg (c.v. = 63,1%). Estatisticamente, esta

perda de peso revelou-se não significativa ( $P>0,05$ ). No mesmo sentido, nem o regime de aleitamento utilizado, nem o número de crias amamentadas afectaram significativamente a perda de peso observada entre as cabras ( $P>0,05$ ).

QUADRO I - PESO CORPORAL MÉDIO DAS CABRAS IMEDIATAMENTE APÓS O PARTO, À PSCPP E AO 1º CIO PÓS-PARTO, EM FUNÇÃO DO TIPO DE PARTO.

Tipo de parto	Parto	PSCPP	1¼ cio
Simple	40,4 <sup>a</sup> $\pm$ 5,1 kg	37,8 <sup>a</sup> $\pm$ 4,2 kg	37,6 <sup>a</sup> $\pm$ 4,7 kg
Duplo	46,9 <sup>b</sup> $\pm$ 3,8 kg	44,6 <sup>c</sup> $\pm$ 4,3 kg	43,7 <sup>b</sup> $\pm$ 4,2 kg

a) b, para  $P\leq 0,01$ ; a) c, para  $P\leq 0,05$  (entre linhas).

Quando da apresentação do 1º cio pós-parto, as cabras Serranas pesavam, em média,  $39,4 \pm 5,3$  kg (c.v. = 13,5%). Também neste caso, o regime de aleitamento aplicado não afectou significativamente o peso corporal apresentado pelas cabras ao 1º cio ( $P>0,05$ ). Por seu turno, as cabras que amamentavam duas crias continuavam a ser mais pesadas do que as que amamentavam somente uma ( $P\leq 0,01$ ) (Quadro I). Em média, entre o parto e o 1º cio pós-parto, as cabras perderam  $2,9 \pm 2,0$  kg (c.v. = 67,0%). Esta perda de peso mostrou-se também estatisticamente não significativa ( $P>0,05$ ). Ao longo deste intervalo, nem o regime de aleitamento utilizado, nem o número de crias amamentadas afectaram igualmente a perda de peso registada entre as cabras ( $P>0,05$ ).

Neste trabalho, as cabras que pariram gémeos foram sempre mais pesadas do que as pariram apenas uma cria. Na verdade, as diferenças de peso observadas entre estes dois grupos de cabras mantiveram-se sensivelmente constantes ao longo de todo o ensaio. Por outro lado, as perdas de peso verificadas entre o parto – PSCPP e o parto – 1º cio pós-parto revelaram-se estatisticamente não significativas. Finalmente, há que referir que o regime de aleitamento utilizado nunca influenciou significativamente a variação do peso corporal observada entre as cabras estudadas.

### Fim do anestro fisiológico pós-parto

A duração do intervalo médio de dias registados entre o parto e a PSCPP foi de  $54,0 \pm 12,4$  (c.v. = 22,9%). A duração deste intervalo não foi significativamente influenciada pelo regime de aleitamento aplicado ( $P>0,05$ ) (Quadro II). Da mesma forma, nem o peso corporal apresentado pelas cabras imediatamente após o parto ou quando da PSCPP, nem o número de crias amamentadas condicionaram significativamente a duração do intervalo parto – PSCPP ( $P>0,05$ ).

QUADRO II - DURAÇÃO MÉDIA DOS INTERVALOS PARTO – PSCPP E PARTO – 1ª CIO PÓS-PARTO E PERCENTAGENS DE CABRAS QUE APRESENTARAM CIO ANTES DA PSCPP E/OU UMA 1ª FASE LÚTEA DE DURAÇÃO NORMAL, EM FUNÇÃO DO REGIME DE ALEITAMENTO.

	Amamentação	Amamentação nocturna + ordenha
Parto – PSCPP	51,3 <sup>a</sup> $\pm$ 11,0 dias (n=27)	57,6 <sup>a</sup> $\pm$ 13,7 dias (n=28)
Parto – 1¼ cio	50,1 <sup>a</sup> $\pm$ 16,1 dias (n=24)	64,4 <sup>a</sup> $\pm$ 19,5 dias (n=26)
% cabras com cio antes da PSCPP	70,0 <sup>a</sup> % (n=27)	57,1 <sup>b</sup> % (n=28)
% cabras com 1ª fase lútea normal	40,0 <sup>a</sup> % (n=24)	42,9 <sup>a</sup> % (n=26)
% cabras com cio e 1ª fase lútea normal	16,7 <sup>a</sup> % (n=21)	57,1 <sup>b</sup> % (n=24)

a) b, para  $P \leq 0,001$  (entre colunas).

Fonseca (1998), utilizando cabras Serranas, ecótipo Transmontano, paridas no Outono (inícios de Novembro), verificou que o regresso à actividade ovárica “completa” ocorreu 17-106 dias (média = 101 dias) após o parto. Por outras palavras, em média, as cabras estudadas por Fonseca (1998) tiveram um período de “inactividade” ovárica pós-parto superior ao das cabras por nós estudadas. É provável que esta diferença se relacione com o facto das cabras estudadas por Fonseca (1998) terem perdido peso de uma forma estatisticamente significativa entre o parto – PSCPP, enquanto que as cabras por nós estudadas o fizeram de um modo estatisticamente não significativo.

Nas cabras Serranas, ecótipo Ribatejano, a duração do período de “inactividade” ovárica pós-parto depende da estação do ano, ocorrendo a retoma da actividade ovárica “completa” 20-85 dias depois do parto (Mascaranhas *et al.*, 1995). Nas cabras Serranas, ecótipo Transmontano, paridas no Inverno (Fevereiro – Março), a actividade ovárica “completa” reinicia-se 38-131 dias após o parto (Correia *et al.*, 2001). Por seu turno, quando estas mesmas cabras parem no Verão (Julho – Agosto), o regresso à actividade ovárica “completa” produz-se 19-75 dias pós-parto (Azevedo *et al.*, 2002). Finalmente, os dados por nós recolhidos indicam que as cabras Serranas, ecótipo Transmontano, paridas no Outono (Novembro – Dezembro), recomeçam a sua actividade ovárica “completa” 40-95 dias depois do parto (Fig. 1). Neste sentido, a retoma da actividade ovárica “completa” pós-parto das cabras Serranas, ecótipo Transmontano, parece depender igualmente da estação do ano.

De acordo com Mascaranhas *et al.* (1995), a estação de anestro das cabras Serranas, ecótipo Ribatejano, estende-se de Janeiro a Maio. Embora a estação reprodutiva das cabras Serranas, ecótipo Transmontano, nunca tenha sido

cientificamente determinada, os dados de campo indicam uma diminuição do número de cobrições entre Janeiro e Abril. Neste sentido, as cabras estudadas terão parido na fase final da estação reprodutiva. Porém, ao contrário do que se esperava, estas cabras retomaram a sua actividade ovárica “completa” em pleno período de anestro sazonal. Na verdade, os dados recolhidos nos trabalhos desenvolvidos por Correia *et al.* (2001) e Azevedo *et al.* (2002) indiciavam que as cabras Serranas, ecótipo Transmontano, possuíam um anestro sazonal algo marcado, capaz, pelo menos, de “camuflar” o anestro pós-parto. Tendo em conta o conjunto dos resultados anteriormente referidos, é possível que, nestas cabras, a duração do período de anestro pós-parto seja condicionada pelo fotoperíodo prevalecente na fase imediatamente posterior ao parto.

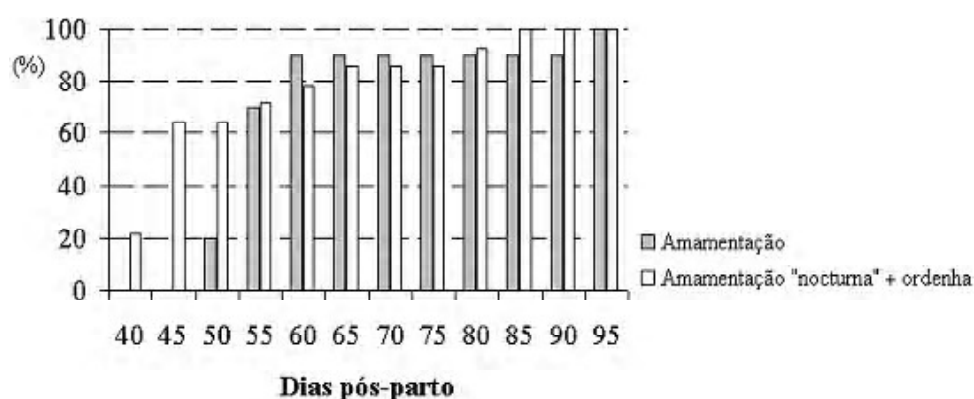


Figura 1. Percentagem acumulada de cabras “cíclicas” nos primeiros 95 dias pós-parto.

A lactação e, de uma forma mais acentuada, a estimulação dos tetos (sucção) afectam negativamente a retoma da actividade sexual pós-parto das fêmeas reprodutoras (Bocquier *et al.*, 1993; Delgadillo *et al.*, 1998; Mwaanga e Janowski, 2000), uma vez que deprimem a secreção de LH (Lozano *et al.*, 1998; Gordon, 1999). Neste ensaio, as cabras que terão sido sujeitas a um maior número de mamadas por dia (permanentemente acompanhadas pelos cabritos) produziram a PSCPP ao mesmo tempo que as restantes cabras, ou seja, neste caso, um maior número de estimulações dos tetos não terá determinado um atraso no reinício da actividade ovárica “completa” pós-parto.

A duração da primeira fase lútea pós-parto foi curta em 58,3% ( $n = 14$ ) das cabras estudadas e normal nas restantes 41,7% ( $n = 10$ ) ( $\chi^2=5,142$ ;  $P\leq 0,05$ ). O regime de aleitamento empregue não afectou significativamente as percentagens de cabras que produziram uma primeira fase lútea de duração curta ou normal ( $\chi^2=0,185$ ;  $P>0,05$ ) (Quadro II). A duração da primeira fase lútea não foi igualmente



influenciada pelo peso das cabras encontrado imediatamente após o parto ou quando da PSCPP, pelo número de crias amamentadas ou pela duração do intervalo parto – PSCPP ( $P>0,05$ ). O reinício da actividade ovária “completa” pós-parto é frequentemente marcado pela ocorrência de ciclos de curta duração (Camp *et al.*, 1983; Tasende *et al.*, 2002), resultantes de um deficiente funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, motivado pela ausência prévia de níveis adequados de progesterona (Garverick *et al.*, 1992; Tasende *et al.*, 2002).

### **Fim do anestro comportamental pós-parto**

Os primeiros sinais detectáveis de cio surgiram, em média,  $56,3 \pm 18,7$  dias após o parto (c.v. = 33,2%). O regime de aleitamento não afectou significativamente a duração do intervalo parto – 1º cio detectável ( $P>0,05$ ) (Quadro II).

Entre as cabras que amamentaram permanentemente as crias, 70,0% manifestou cio antes da PSCPP, enquanto as restantes 30,0% só o fizeram 13-30 dias após a PSCPP ( $\chi^2=32,000$ ;  $P\leq 0,001$ ). De entre as cabras que amamentaram as crias apenas durante o período “nocturno” do dia e que foram diariamente ordenhadas, 57,1% apresentou cio alguns dias antes da PSCPP, enquanto que as restantes 42,9% só o fizeram 11-34 dias após a PSCPP ( $\chi^2=3,920$ ;  $P\leq 0,05$ ). Do ponto de vista estatístico, a diferença observada entre estes dois grupos de cabras revelou-se não significativo ( $\chi^2=3,646$ ;  $P>0,05$ ). Segundo Chemineau (1987), a retoma da actividade sexual sazonal é frequentemente marcada pela ocorrência de ovulações silenciosas. No trabalho realizado por Correia *et al.* (2001), nenhuma das cabras paridas no Inverno apresentou cio antes da PSCPP. Por seu turno, no ensaio levado a cabo por Azevedo *et al.* (2002), todas as cabras paridas no Verão manifestaram cio antes da PSCPP. Assim, tudo indica que a retoma da actividade éstrica pós-parto das cabras Serranas, ecótipo Transmontano, depende também da estação do ano em que o parto ocorre.

A diferença observada entre grupos, relativamente à percentagem de cabras que apresentaram cio antes da PSCPP e uma primeira fase lútea de duração normal, mostrou-se estatisticamente significativa ( $\chi^2=34,320$ ;  $P\leq 0,001$ ) (Quadro II). Esta foi estatisticamente mais elevada entre as cabras que amamentaram as crias apenas durante o período “nocturno” do dia e que foram diariamente ordenhadas do que entre as cabras que amamentaram permanentemente as suas crias (57,1% vs. 16,7%).

De acordo com o conjunto dos resultados anteriormente apresentados, a retoma da actividade sexual pós-parto das cabras Serranas, paridas no final do

Outono, é francamente difícil, independentemente do regime de aleitamento considerado – amamentação vs. amamentação “nocturna” + ordenha.

### CONCLUSÕES

Face às condições em que este trabalho foi desenvolvido, à metodologia empregue e aos resultados conseguidos, pensamos ser possível tirar o seguinte conjunto de conclusões:

- A duração do intervalo médio de dias registados entre o parto e a PSCPP foi de  $54,0 \pm 12,4$  (40-95 dias).
- A duração da primeira fase lútea pós-parto foi curta em 58,3% das cabras estudadas e normal nas restantes 41,7%.
- A duração do intervalo médio de dias observados entre o parto e o 1º cio pós-parto foi de  $56,3 \pm 18,7$ . Cerca de 62,5% das cabras Serranas estudadas apresentaram cio antes da PSCPP, enquanto as restantes 37,5% só o fizeram depois.
- A retoma da actividade sexual pós-parto não variou significativamente em função do regime de aleitamento utilizado.

### BIBLIOGRAFIA

- AZEVEDO, J., CORREIA, T.M., ALMEIDA, J.C., VALENTIM, R.C., FONTES, P., COELHO, A. e MENDONÇA, A.L., 2002. Anoestro *postpartum* en cabras de la raza Serrana – ecotipo Transmontano – paridas en verano. In: Revista de la SEOC, XXVII Jornadas Científicas y VI Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Valencia, Espanha, pp. 978-982.
- BOCQUIER, F., KANN, G. e THIMONIER, J., 1993. Effects of body composition variations on the duration of the *postpartum* anovulatory period in milked ewes submitted to two different photoperiods. *Reprod. Nutr. Dev.*, 33: 395-403.
- CAMP, J.C., WILDT, D.E., HOWARD, P.K., STUART, L.D. e CHAKRABORTY, P.K., 1983. Ovarian activity during normal and abnormal length estrous cycles in the goat. *Biol. Reprod.*, 28 (3): 673-681.
- CHEMINEAU, P., 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats - a review. *Livestock Production Science*, 17: 135-147.
- CORREIA, T.M., VALENTIM, R.C., AZEVEDO, J., MAURÍCIO, R., GALVÃO, L., MENDONÇA, A. e CARDOSO, M., 2001. Período anovulatório pós-parto em cabras da raça Serrana paridas no Inverno. *Revista Veterinária Técnica*, 2: 14-17.

- CORTEEL, J.M., 1972. L'insémination artificielle caprine. Bases physiologiques. Etat actuel et perspectives d'avenir. *Elevage et Insémination*, 132: 4-32.
- DELGADILLO, J.A., FLORES, J.A., VILLARREAL, O., FLORES, M.J., HOYOS, G., CHEMINEAU, P. e MALPAUX, B., 1998. Length of postpartum anoestrus in goats in subtropical Mexico: effect of season of parturition and duration of nursing. *Theriogenology*, 49 (6): 1209-1218.
- DUNN, O.J., 1961. Multiple comparisons among means. *J. American Statistical Association*, 56: 52-64.
- FONSECA, A.M.C., 1998. Determinação do período de anestro pós-parto da cabra Serrana, ecótipo Transmontano. Escola Superior Agrária de Bragança, 28 p. (Documento interno)
- GARVERICK, H.A., ZOLLER Jr., W.G. e SMITH, M.F., 1992. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal and subnormal luteal function. *Anim. Reprod. Sci.*, 28: 111-124.
- GONZALEZ LOPEZ, J., 1993. Actividad ovárica y sexual durante el anoestro de lactación. *Ovis, Tratado de Patología y Producción Ovina*, 28: 35-50.
- GORDON, I., 1999. Controlled reproduction in sheep & goats. In: *Controlled reproduction in farm animals series. Volume 2*, CABI International, Reino Unido, 450 p.
- LOZANO, J.M., FORCADA, F. e ABECIA, J.A., 1998. Opioidergic and nutritional involvement in the control of luteinizing hormone secretion of postpartum Rasa Aragonesa ewes lambing in the mid-breeding season, *Anim. Reprod. Sci.*, 4 (52): 267-277.
- MASCARANHAS, R., NUNES, A.S. e SILVA, J.R., 1995. Cyclic reproductive activity and efficiency of reproduction in Serrana goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 38: 223-229.
- MWAANGA, E.S. e JANOWSKI, T., 2000. Anoestrus in dairy cows: causes, prevalence and clinical forms. *Reprod. Dom. Anim.*, 35: 193-200.
- SHORT, R., BELLOWSIR, R., BERARDINELLI, J. e CUSTER, E., 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in *postpartum* beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 68: 799-816.
- SNEDECOR, G.W. e COCHRAN, W.G., 1980. *Statistical methods*. 7ª Ed., Iowa State University Press, Ames, IA, 185 p.
- STEEL, R.G.D. e TORRIE, J.H., 1980. *Principles and Procedures of Statistics*. 2ª Ed., McGraw-Hill Company, Nova Iorque, 633 p.

TASENDE, C., MEIKLE, A., RODRÍGUEZ-PIÑON, M., FORSBERG, M. e GARÓFALO, E.G., 2002. Estrogen and progesterone receptor content in the pituitary gland and uterus of progesterone-primed and gonadotropin releasing hormone-treated anestrus ewes. *Theriogenology*, 57 (6): 1719-1731.

## MORPHOLOGIC AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE BRANCHIAL EPITHELIUM OF TELEOSTEAN FISH

S.M. MONTEIRO<sup>1</sup>, A. FONTAÍNHAS-FERNANDES<sup>1</sup> e M. SOUSA<sup>2</sup>

1. UTAD-CETAV, Apartado 1013, 5000-911 Vila Real, Portugal

2. ICBAS, Universidade do Porto, Portugal

*(Aceite para publicação em 1 de Março de 2004)*

### ABSTRACT

It is now currently accepted that the gills fulfil several functions in fish, mainly dealing with respiration e osmoregulation. In teleosts, it is constituted by four pairs of gill arches, all of which support two rows of filaments. Bilaterally located, secondary lamellae branch from the central axis of the filament. The lamellae are designed for gas exchange with a large surface area. The multifunctional role of the gill is reflected by the complexity of its epithelium, which can be divided in a stratified epithelium that surrounds the filament and presents a close relationship with the venous compartment and a lamellar epithelium that covers the free part of lamellae e has an exclusive relationship with the arterio-arterial vasculature. Filamentar epithelium contains the chloride cells, which vary in morphology and number according to the milieu where the fish lives, the pavement cells which function is still in debate and mucous cells. The presence of accessory and neuroepithelial cells is also characteristic of the filament epithelium of fresh and salt-water fishes. The lamellar epithelium consists of an outermost layer of pavement cells that exhibit structural characteristics suggestive of cell coat secretion and an inner most layer of less differentiated cells.

**Key-words:** chloride cells, filamentar epithelium, osmoregulation, teleosts

## CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRASTRUTURAL DO EPITÉLIO BRANQUIAL DE PEIXES TELEÓSTEOS

### RESUMO

É correntemente aceite que a brânquia é responsável pelo desempenho de várias funções, nomeadamente, no que diz respeito à respiração e osmoregulação. Em peixes teleósteos, ela é constituída por quatro pares de arcos branquiais, que servem de suporte a duas fileiras de filamentos. A partir do eixo central do filamento, projectam-se, bilateralmente, as lamelas, que constituem a superfície de trocas e que possuem uma vasta área superficial. A multifuncionalidade da brânquia é reflectida pela complexidade do seu epitélio que se pode dividir em epitélio filamentar estratificado que reveste o filamento e se encontra em contacto directo com o seio venoso central

e epitélio lamelar que delimita as lamelas e está em contacto exclusivo com o sistema vascular artério-arterial. O epitélio filamental é constituído por células de cloro, cuja morfologia e número variam de acordo com o meio no qual o peixe se encontra, por células pavimentosas, cuja função ainda não foi esclarecida, e por células mucosas. A presença de células acessórias e neuroepiteliais, bem como, células indiferenciadas, também é característica do epitélio filamental tanto de peixes de água doce como salgada. O epitélio lamelar consiste numa camada mais externa de células pavimentosas e por uma camada mais interna de células menos diferenciadas.

**Palavras-chave:** células de cloro, epitélio filamental, osmoregulação, teleósteos

## INTRODUÇÃO

A brânquia é a principal superfície corporal envolvida nas trocas gasosas, tendo a sua presença um efeito marcado na anatomia e no funcionamento do resto do corpo dos peixes (Hughes, 1984). Desempenha, também, um papel crucial na regulação ácido-base, na osmoregulação e na excreção de substâncias azotadas (Goss *et al.*, 1998; Piiper, 1998; Randall e Brauner, 1998).

A organização geral da brânquia dos teleósteos baseia-se num sistema de subdivisões sucessivas: arcos, filamentos e lamelas branquiais. O arco branquial situa-se entre as cavidades bucal e opercular, possui uma estrutura cartilaginosa e constitui a base de suporte dos numerosos filamentos, que se projectam para o interior da cavidade opercular (Bone e Marshall, 1982). Na sua margem interior, apresenta projecções filamentosas denominadas rastilhos branquiais que impedem a passagem de partículas sólidas através dos filamentos e lamelas (White, 1977). O espaço existente entre os arcos da brânquia, designado fenda branquial, representa a única via de comunicação entre as cavidades bucal e opercular. Através desta fenda estabelece-se um fluxo contínuo de água, como consequência de um sistema de bombeamento eficiente onde intervêm ambas as cavidades (Hughes, 1984; Pisam *et al.*, 1989). Os filamentos branquiais, de natureza dupla, apresentam inúmeras projecções secundárias nas superfícies dorsal e ventral, as lamelas, dispostas perpendicularmente aos mesmos (Laurent, 1982; Lee *et al.*, 1996a). Estas estruturas são as responsáveis pelos processos respiratórios de modo que, o número e o tamanho relativo das lamelas determinam a área respiratória das brânquias (Laurent e Dunel, 1980).

A captação do oxigénio da água é favorecida por esta subdivisão dos filamentos em lamelas e pela direcção da corrente sanguínea nas lamelas branquiais, a qual é oposta à do fluxo de água que as atravessa. Esta circulação constitui um verdadeiro sistema de contracorrente que assegura uma boa

oxigenação do sangue. O fluxo do sangue contrário ao da água, permite manter um gradiente de difusão através das brânquias, de modo a que o oxigénio entre e o dióxido de carbono seja libertado (Bone e Marshall, 1982).

O carácter multifuncional da brânquia é traduzido pela complexidade do seu epitélio. Tanto a lamela como o filamento, encontram-se revestidos por tecido epitelial, geralmente, subdividido em duas regiões (Laurent e Dunel, 1980): o epitélio filamentar que reveste o filamento e o epitélio lamelar que limita as lamelas. A distinção entre estes epitélios efectua-se com base na sua localização, estrutura e padrão de vascularização.

### EPITÉLIO FILAMENTAR

Trata-se de um epitélio estratificado que reveste o filamento, também denominado por epitélio interlamelar (Fig. 1), ainda que, este seja um termo muito restritivo dada a sua ampla distribuição. O compartimento vascular associado ao epitélio filamentar é o seio venoso central (Dunel e Laurent, 1980a; Laurent, 1982, 1984). No epitélio filamentar, foram identificados, pelo menos, cinco tipos de células diferenciadas: pavimentosas, mucosas, de cloro, acessórias e neuroepiteliais. Na camada mais profunda do epitélio encontraram-se, ainda, as células indiferenciadas (Laurent, 1984; Lee *et al.*, 1996b).

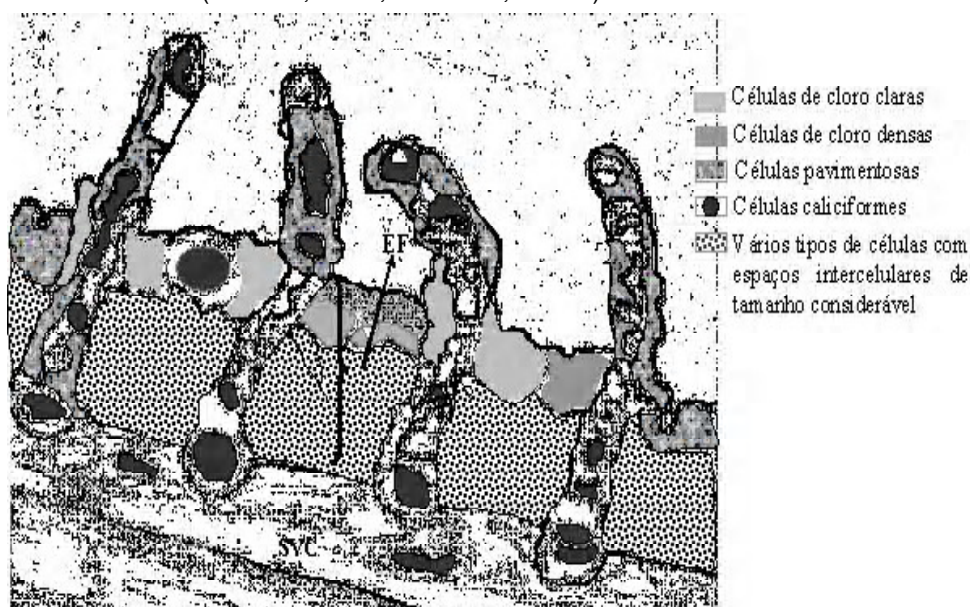


Figura 1. Representação do epitélio branquial; EF, epitélio filamentar; SVC, seio venoso central.

### **A. Células pavimentosas**

As células pavimentosas são as mais frequentes nos espaços interlamelares (Roncero *et al.*, 1990), predominando também no epitélio da lamela (Wong e Chan, 1999). Em geral, representam mais de 95% do epitélio branquial (Goss *et al.*, 1995).

A morfologia externa das células pavimentosas é caracterizada por uma diversidade de formas, que variam desde projecções longas e elaboradas, organizadas concentricamente (Wong e Chan, 1999), até à presença simples de microvilosidades (Perry *et al.*, 1992a,b). A morfologia e o tamanho destas formações variam com a espécie e a sua função ainda não foi esclarecida. No entanto, alguns autores sugerem que possam desempenhar um papel importante na adesão do muco à superfície epitelial, enquanto outros defendem que estão relacionadas com a absorção iónica e a regulação ácido-base (Goss *et al.*, 1992a, 1994a).

Não obstante a sua morfologia externa irregular, estas células são, predominantemente, pavimentosas. Contudo, existe uma pequena população cuja forma é grosseiramente cilíndrica ou piriforme (Pisam *et al.*, 1989), às quais ainda não foi atribuída uma função específica. Estas células modificadas predominam no revestimento da superfície filamentar (Lee *et al.*, 1996a), e são caracterizadas por possuírem um número elevado de vesículas citoplasmáticas e uma membrana apical profundamente pregueada.

As células pavimentosas lamelares possuem algumas mitocôndrias, consideradas necessárias nas células de transporte activo, bem como outras características ultrastruturais que sugerem uma actividade metabólica elevada, entre as quais se destacam um aparelho de Golgi muito desenvolvido, um retículo endoplasmático rugoso abundante e numerosas vesículas (Laurent e Dunel, 1980). Nas células pavimentosas, regista-se também a presença de uma rede de microfilamentos com um diâmetro de aproximadamente 20 nm. Estas células estão interligadas entre si e com as células de cloro vizinhas através de desmossomas e de junções ocludentes (Wendelaar-Bonga e Van der Meij, 1989). O núcleo é basal, possui um contorno irregular com numerosas indentações, heterocromatina marginal abundante e um nucléolo central (Roncero *et al.*, 1990).

Durante muito tempo, pensou-se que a única função das células pavimentosas era a de efectuar trocas gasosas durante o processo respiratório, facto, que se prendia com o predomínio deste tipo celular nas lamelas, principal



local para a respiração. No entanto, os resultados de diversos estudos efectuados com o objectivo de esclarecer o mecanismo de troca iónica e a sua localização na brânquia (Girard e Payan, 1980; Avella *et al.*, 1987; Goss *et al.*, 1992a, b, 1994a,b, 1995; Sullivan *et al.*, 1995; Perry e Fryer, 1997), sugerem que as células pavimentosas constituem um potencial local de captação de alguns iões, podendo consequentemente, exercer um controlo importante na manutenção do equilíbrio ácido-base. A função exacta desempenhada pelas células pavimentosas é, ainda, controversa. Determinados autores (Girard e Payan, 1980; Avella *et al.*, 1987; Goss *et al.*, 1992a, b, 1994, 1995; Sullivan *et al.*, 1995; Perry e Fryer, 1997), defendem que estas células constituem o principal local de captação dos iões  $\text{Na}^+$ , outros sugerem que são o ponto dominante de ambas as vias de transporte, de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (Payan *et al.*, 1984). O ponto de vista mais aceite, aponta para que ambos os processos sejam realizados pelas células de cloro (Foskett e Scheffey, 1982; Avella *et al.*, 1987; Perry e Laurent, 1989; Wood, 1991). Contudo, estas teorias têm como ponto comum que a captação de  $\text{Na}^+$  está, de alguma forma, directamente associada com a excreção de  $\text{H}^+$  (através de trocas  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e/ou através de uma enzima  $\text{H}^+$ -ATPase e um sistema de canais de sódio) (Lin e Randall, 1993) e, pelo menos indirectamente, com a excreção de amónia, por difusão e/ou troca  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  (Wilson *et al.*, 1998).

Na realidade, estas células possuem os pré-requisitos necessários para o funcionamento apropriado de uma bomba protónica ( $\text{H}^+$ -ATPase), nomeadamente, a presença de mitocôndrias e a actividade elevada da enzima anidrase carbónica (Perry e Fryer, 1997). As mitocôndrias são necessárias para o fornecimento de ATP, enquanto a enzima proporciona o  $\text{H}^+$  proveniente da hidratação catalisada do  $\text{CO}_2$ . A  $\text{H}^+$ -ATPase constitui assim, o mecanismo pelo qual a expulsão de iões  $\text{H}^+$  origina um potencial de membrana necessário para a entrada dos iões  $\text{Na}^+$  através dos canais de sódio (Avella e Bornancin, 1989). A bomba protónica parece estar predominantemente localizada na membrana apical e em vesículas citoplasmáticas sub-apicais. Estas vesículas transportam a bomba desde o aparelho de Golgi até próximo da superfície celular. Posteriormente, as vesículas fundem-se com a porção apical da membrana citoplasmática, alterando a morfologia superficial da célula pavimentosa e activando a bomba protónica (Goss *et al.*, 1998).

Em determinadas espécies, estas células parecem estar envolvidas no revestimento da cripta apical das células de cloro controlando, desta forma, os processos de transporte iónico deste ultimo tipo celular (Daborn *et al.*, 2001).

## **B. Células de cloro**

As células de cloro foram identificadas pela primeira vez por Keys e Wilmer (1932), em teleósteos adaptados a água salgada. Estes autores descreveram-nas como sendo células ricas em mitocôndrias, responsáveis pela secreção de cloro. O seu envolvimento específico na secreção de cloro, em peixes de água salgada, foi posteriormente, confirmada por Foscett e Scheffey (1982). Células ricas em mitocôndrias, semelhantes às células secretoras de cloro dos teleósteos marinhos, estão também presentes no epitélio branquial de peixes de água doce, sendo igualmente denominadas células de cloro. Segundo Perry (1997), esta nomenclatura pode ser inapropriada uma vez que a estrutura e, em parte, a função destas células são marcadamente diferentes, quando comparamos peixes marinhos com peixes de água doce. Consequentemente, as células de cloro dos peixes de água doce também são denominadas células ricas em mitocôndrias ou ionócitos.

Na maioria das espécies de teleósteos, as células de cloro ocupam apenas uma pequena fracção, geralmente, inferior a 15% da superfície epitelial exposta ao meio externo (Perry, 1997). A sua localização varia com a espécie e, em alguns casos, com o meio. Em geral, encontram-se no epitélio filamentar, concentradas nas regiões inter-lamelares e nas junções entre o filamento e a lamela. Por vezes, podem também estar presentes no epitélio lamelar (Laurent *et al.*, 1995; Avella *et al.*, 1987; Laurent e Perry, 1991; Varsamos *et al.*, 2002).

O ápex destas células possui um aspecto característico que permite a sua distinção das células pavimentosas e mucosas que as rodeiam. Apresenta microvilosidades (King e Hossler, 1991; Lee *et al.*, 1996b) que, provavelmente, têm origem no aparelho de Golgi e são transportadas pelo sistema vesiculo-tubular para o exterior (Varsamos *et al.*, 2002). Encontram-se firmemente unidas às células pavimentosas vizinhas através de complexos de junção longos e apertados (Dunel e Laurent, 1980; Laurent, 1982, 1984). A sua forma pode variar desde ligeiramente convexa, salientando-se sobre as células pavimentosas, até côncava, formando criptas apicais. Assim, uma característica da membrana apical das células de cloro é a sua variação com a espécie (Perry *et al.*, 1992b) e as condições ambientais (Kultz *et al.*, 1995). Pisam e Rambourg (1991) verificaram que nos peixes aclimatados à água doce, existe uma ligeira recessão na membrana apical das células de cloro, enquanto, nos peixes adaptados a água salgada, a membrana assume uma depressão muito mais profunda, formando criptas apicais. No entanto, vários autores referem a existência de criptas apicais proeminentes nas

células de cloro de peixes aclimatados a água doce (Fishelson, 1980; Hossler *et al.*, 1985; King e Hossler, 1991; Cioni *et al.*, 1991).

A presença de um glicocálice bem desenvolvido, por vezes preenchendo toda a cavidade apical, também está associada ao seu aspecto exterior. Como foi demonstrado em estudos histoquímicos e autorradiográficos (Pisam *et al.*, 1980), este revestimento é rico em polissacáridos que fixam os iões  $\text{Cl}^-$  na cavidade apical (Copeland, 1948), podendo, assim, modificar a composição do ambiente imediato da célula e, portanto, estar envolvido no processo de trocas iónicas (Pisam *et al.*, 1980; Varsamos *et al.*, 2002).

Ao contrário da diversidade observada na estrutura superficial, a ultraestrutura das células de cloro não varia com a espécie (Kessel e Beams, 1962; Laurent, 1984; Wendelar Bonga e Van der Meij, 1989; Wendelaar-Bonga *et al.*, 1990; Pisam e Rambourg, 1991). A ultraestrutura é caracterizada pela presença de um número elevado de mitocôndrias, as quais se encontram associadas a um sistema tubular que preenche quase todo o citoplasma, à excepção da área de Golgi e duma banda estreita, localizada imediatamente por baixo da superfície apical (Pisam e Rambourg, 1991). Esta rede tridimensional de túbulos anastomosados, está em continuidade com a membrana plasmática basolateral, permitindo, deste modo, a expansão da área superficial (Karnaky, 1986; Pisam e Rambourg, 1991). O sistema de túbulos tem sido referido como sistema tubular para se distinguir de outros sistemas membranares, designadamente, o retículo endoplasmático, em continuidade com o invólucro nuclear, e o sistema vesiculo-tubular (Pisam *et al.*, 1989), na região apical. A membrana dos túbulos possui unidades proteicas repetidas, as quais se julga serem constituídas pela enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Assim, as células de cloro também são caracterizadas pela abundância desta enzima que, com o ATP proveniente das numerosas mitocôndrias localizadas na proximidade, pode estar directamente envolvida na osmoregulação (Epstein *et al.*, 1980; Karnaky, 1986; Pisam e Rambourg, 1991).

A região sub-apical é caracterizada pela ausência do sistema tubular e pela presença de vesículas de dimensões variadas (Perry, 1997). Adicionalmente, Wong e Chan (1999) detectaram um teor elevado em filamentos de actina, os quais, provavelmente, desempenham um papel crucial na manutenção da forma celular e na arquitectura da cripta apical. Estes filamentos de actina, pertencentes ao citoesqueleto, mostraram estar envolvidos na abertura e no encerramento da cripta apical das células de cloro de *Periophthalmodon schlosseri* expostos a diferentes salinidades, contribuindo, deste modo, para o controlo dos processos de transporte iónico desempenhados por este tipo celular (Sakamoto *et al.*, 2000).

O núcleo apresenta-se quase esférico e de dimensões consideráveis, possui um nucléolo e uma fina rede de cromatina, e ocupa uma posição mais ou menos central. No entanto, por vezes, a célula é ligeiramente alongada, aproximando-se da forma cilíndrica e, neste caso, o núcleo está mais próximo da base celular (Keys e Willmer, 1932).

Está bem estabelecido que as células de cloro apresentam diferenças estruturais subtis quando observadas ao microscópio electrónico de transmissão. Talvez a mais notável seja a presença de células densas (osmiofílicas) e claras (Wendelaar Bonga e Van der Meij, 1989; Wendelaar Bonga *et al.*, 1990). No entanto, ainda não está esclarecido se estas diferentes características ultraestruturais reflectem a existência de dois sub-tipos de células de cloro ou, simplesmente, diferentes estádios de desenvolvimento de um mesmo tipo celular (Wendelaar Bonga e Van der Meij, 1989; Varsamos *et al.*, 2002). Com base em observações extensivas realizadas em microscopia electrónica, Pisam *et al.* (1987, 1993, 1995) postularam a presença de dois tipos celulares, as células  $\alpha$  e  $\beta$ , que diferem na sua localização e propriedades da membrana apical e sub-apical. As células  $\alpha$ , mais claras e alongadas, encontram-se, predominantemente, localizadas na base das lamelas, em contacto estreito com os capilares sanguíneos lamelares. As células  $\beta$  são mais densas, apresentam forma ovóide ou cúbica e estão, exclusivamente, localizadas na porção inter-lamelar do epitélio do filamento. Nunca foram observadas em contacto com os capilares arteriais da lamela. Por outras palavras, as células a estão em contacto com o sangue arterial e as células b relacionam-se, principalmente, com o seio venoso central (Jürss e Bastrop, 1995).

A membrana apical das células  $\alpha$  é caracterizada por extensas invaginações e projecções, enquanto o citoplasma sub-apical possui numerosas vesículas (distintas do sistema tubular) pouco densas. O núcleo está localizado na região basal da célula e as numerosas mitocôndrias encontram-se distribuídas por todo o citoplasma. A membrana apical das células  $\beta$  é lisa e o citoplasma sub-apical possui estruturas apicais densamente coradas que, apesar de independentes do sistema tubular, penetram profundamente na rede tubular da célula.

Apesar da evidência para a real existência de diferentes sub-tipos de células de cloro ser consistente, a possibilidade de estas células representarem diferentes estádios de desenvolvimento ou de actividade de um mesmo tipo celular, não pode ser excluída. Com efeito, Wendelaar Bonga *et al.* (1990) demonstraram a existência de células de cloro em quatro estádios de desenvolvimento diferentes, que designaram de células acessórias, imaturas, maduras e apoptóticas, opinião que foi posteriormente corroborada por Varsamos *et al.* (2002). Segundo os

mesmos autores, diferentes estádios de desenvolvimento estavam também associados a propriedades ultrastruturais diferentes. Num estudo prévio Wendelaar Bonga e Van der Meij (1989), interpretaram a progressiva densificação e arredondamento das células, bem como a perda de contacto com a água, como sinais de degeneração por apoptose. Esta descoberta não contradiz as conclusões de Pisam *et al.* (1993, 1995) sugerindo, contudo, explicações alternativas para as diferentes morfologias observadas nas células de cloro.

As células de cloro desempenham, provavelmente, um papel crucial na osmoregulação dos peixes teleósteos (Evans *et al.*, 1999). Pensa-se que são responsáveis pela captação de pequenas quantidades de iões em água doce (Avella *et al.* 1987) e que secretam grandes quantidades de sais em água salgada (Foskett e Sheffey, 1982). Apesar do desempenho da sua função na excreção de NaCl em água salgada estar completamente elucidado, várias propostas têm sido avançadas para a sua acção em peixes de água doce (revisto por Marshall, 2002). Apesar da controvérsia actual relativa à função das células de cloro nos teleósteos de água doce, é consensual que a brânquia é o local de absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , contribuindo de forma decisiva para a manutenção do equilíbrio iónico. Embora, inicialmente, esta capacidade de bombeamento tenha sido atribuída às células de cloro, estudos realizados *in vivo* não permitiram a sua localização precisa (Avella *et al.*, 1987). Sabe-se que, ao nível do sistema tubular, estão localizadas enzimas transportadoras de iões, nomeadamente a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e proteínas de contratransporte  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  o que, na opinião de alguns autores, constitui a prova irrefutável de que estas células estão envolvidas na captação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (Laurent e Perry, 1990) e na captação e transporte activo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Perry *et al.*, 1992a; Flik e Verbost, 1993; Wong e Chan 1999). Outros, acreditam apenas no seu envolvimento relativamente ao transporte do ião  $\text{Cl}^-$  (Goss *et al.*, 1992 a, b; Morgan *et al.*, 1994). Efectivamente, alguns estudos, demonstraram que a captação de  $\text{Na}^+$  ocorre na lamela secundária onde predominam células pavimentosas (Payan *et al.*, 1984).

O modelo explicativo da captação de  $\text{Na}^+$ , actualmente aceite, envolve a presença na membrana apical de uma  $\text{H}^+$ -ATPase que gera um grande potencial de membrana e conduz à entrada de  $\text{Na}^+$  na célula através de canais específicos (revisto por Evans *et al.*, 1999). Sullivan *et al.* (1995), detectaram que a imunoreactividade para a  $\text{H}^+$ -ATPase encontrava-se restrita a células pavimentosas. Por outro lado, Lin *et al.* (1994) e Wilson *et al.* (2000) observaram imunoreactividade tanto em células pavimentosas como em células de cloro. Relativamente aos canais de  $\text{Na}^+$ , a sua imuno-localização foi feita, quer em células

de cloro como em células pavimentosas da lamela (Wilson *et al.*, 2000). De acordo com isto, mais estudos são necessários para identificar a ocorrência precisa da captação de  $\text{Na}^+$ , que pode apresentar variação interespecífica. Na realidade, Marshall (2002) refere a possível existência de uma diferença fundamental nas estratégias de regulação iónica de teleósteos eurialinos que se adaptam temporariamente a água doce (tilápia) em oposição aos residentes nesse meio (truta e carpa).

Os resultados de diversos estudos realizados com uma ampla variedade de técnicas, relacionam também as células de cloro com captação de cálcio nos peixes de água doce. Perry *et al.* (1992a) demonstraram que a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  está positivamente correlacionada com a área superficial e/ou o número de células de cloro. Adicionalmente, a captação deste ião é inibida pela exposição a lantânio ( $\text{LaCl}_3$ ), um potente antagonista dos canais de cálcio. A sua utilização tem permitido demonstrar com êxito a presença destes canais na membrana apical das células de cloro (Perry e Flik, 1988). Wong e Chan (1999) confirmaram estes resultados pela detecção, nas células de cloro, de níveis enzimáticos da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase muito elevados. De acordo com o acima descrito, podemos assumir que este tipo celular constitui o local de transporte transcelular activo de cálcio, como postulado no modelo actualmente aceite (Flik e Verbost, 1993). Contudo, é necessário ter presente que, quando diminuída a área superficial das células de cloro, como por exemplo, em situação de acidose, os peixes são capazes de desenvolver mecanismos compensatórios, de modo a ultrapassar o efeito adverso deste fenómeno na captação de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este facto pode ser indicador de que as células pavimentosas também desempenham um papel importante na captação deste ião, em condições de reduzida disponibilidade das células de cloro (Perry, 1997).

As células de cloro também parecem estar envolvidas na regulação do equilíbrio ácido-base dos peixes. Com efeito, vários estudos realizados recentemente têm contribuído para esclarecer o seu papel, directo ou indirecto, na regulação ácido-base (Goss *et al.*, 1992b, 1995). A respiração em meio aquático, comparativamente à respiração aérea, impõe importantes restrições aos mecanismos compensatórios de regulação do equilíbrio ácido-base. A manutenção do pH interno é conseguida pela sucessão de dois mecanismos: 1) tamponização a nível interno das moléculas mais relevantes para o balanço ácido-base e 2) sua, posterior eliminação para o meio externo. Em alcalose, a excreção da base ( $\text{HCO}_3^-$ ) é conseguida aquando da captação de  $\text{Cl}^-$ , enquanto em acidose a captação de sódio contribui para a eliminação do ião  $\text{H}^+$  (Goss *et al.*, 1992a).

### **C. Células acessórias**

As células acessórias foram observadas pela primeira vez por Dunel e Laurent (1973), na pseudobrânquia de teleósteos. Mais tarde, descobriu-se que também existiam no epitélio da brânquia. Desde então, estas células têm sido observadas em várias espécies (Dunel e Laurent, 1980b; Hootman e Philpott, 1980), sendo a sua presença referida como uma das alterações induzidas pela passagem dos peixes de água doce para água salgada. Geralmente, estas células estão próximas ou em íntima associação com a porção apical das células de cloro. Processos citoplasmáticos finos estendem-se do corpo das células acessórias, interdigitando-se com os processos apicais das células de cloro adjacentes. Assim, as superfícies das criptas apicais das células de cloro em peixes adaptados a água salgada, são formadas por um mosaico de processos celulares, com arborizações de ambos os tipos de células a contribuir para a margem da cripta, constituindo um complexo multicelular (Laurent, 1982, 1984). As duas células estão unidas por um complexo de junção muito curto e específico que difere das junções longas e apertadas que ligam as células de cloro ou as acessórias às células pavimentosas vizinhas (Sardet, 1980). As interdigitações maximizam a distância linear das vias paracelulares mais frouxas, constituindo uma característica morfológica de epitélios de secreção especializados.

Descobriu-se mais tarde (Hwang, 1988a; Pisam *et al.*, 1989) que os peixes de água doce também possuíam complexos multicelulares os quais podem aumentar a permeabilidade do epitélio, estando, deste modo, associadas à captação iónica (Hwang, 1988b). Contudo, estas estruturas não evidenciam interdigitações citoplasmáticas entre as células acessórias e as células de cloro. Adicionalmente, as junções frouxas que existem entre as células de cloro, nos peixes de água doce, são mais profundas do que as existentes nos peixes de água salgada. Assim, pode inferir-se que a grande diferença na taxa de mobilidade iónica entre os epitélios branquiais dos peixes de água doce e de água salgada, estão associadas com estas diferenças ultrastruturais (Sardet, 1980; Hwang, 1988b).

As células acessórias podem distinguir-se das células de cloro essencialmente por duas características. Em primeiro lugar, o citoplasma das células acessórias é mais denso e os processos apicais das suas interdigitações com o citoplasma apical das células de cloro podem distinguir-se claramente. Em segundo lugar, as cristas mitocondriais das células acessórias são mais pequenas e menos numerosas do que nas células de cloro (Laurent e Dunel, 1980), o sistema

tubular encontra-se mais vagamente anastomosado, e o sistema vesiculotubular é menos notável, com menos túbulos e vesículas (Pisam e Rambourg, 1991). Por outro lado, o retículo endoplasmático rugoso aparece mais desenvolvido (Wendelaar Bonga e Van der Meij, 1989). Uma outra diferença entre as células acessórias e as células de cloro está relacionada com a aparência do glicocálice da superfície apical. O revestimento filamentoso que se encontra nas extensões das células acessórias é mais compacto e está mais bem preservado do que o revestimento superficial, mais amorfo, das células de cloro. Esta diferença ao nível do revestimento da superfície apical torna possível identificar a contribuição das células acessórias para a cripta superficial (Hootman e Philpott, 1980). Estes autores referem ainda a presença de lisossomas de dimensões consideráveis e de aparência variável nas células acessórias.

Hootman e Philpott (1980), Wendelaar Bonga e Van der Meij (1989) e Wendelaar Bonga *et al.* (1990) sugerem que as células acessórias, dado o seu tamanho reduzido e o menor desenvolvimento dos sistemas membranosos intracitoplasmáticos, podem corresponder a células de cloro jovens. Este ponto de vista, contudo, não é apoiado por Dunel e Laurent (1973) nem por Laurent e Dunel (1980), que defendem que as células acessórias são um tipo celular distinto. Posteriormente, Chretien e Pisam (1986) confirmaram esta última teoria, ao descobrirem que as células de cloro e as acessórias possuem origem e formas de diferenciação distintas.

#### **D. Células mucosas**

As células mucosas, também denominadas caliciformes, encontram-se em número elevado na brânquia, predominantemente, no epitélio filamentar. Por vezes, estendem-se até ao arco branquial (Dunel e Laurent, 1980b; Laurent, 1984). Estas células são caracterizadas pela presença de vesículas de muco, com uma aparência fina e granular, que se encontram rodeadas por membrana. Na periferia celular encontra-se retículo endoplasmático rugoso, existindo muitos ribossomas livres, disseminados por todo o citoplasma, e poucas mitocôndrias. Na base da célula está localizado o aparelho de Golgi, a partir do qual se originam as vesículas mucosas. Na extremidade apical parece não existir nenhuma membrana a separar o conteúdo celular do exterior (Baker, 1969).

Estas células são responsáveis pela secreção de mucina, uma glicoproteína com teor elevado em resíduos de ácido siálico, que é o principal componente orgânico do muco (Handy, 1989). A camada mucosa, juntamente com a camada



limite de água imediatamente adjacente à superfície lamelar, fornece um microambiente branquial, cujas condições podem diferir substancialmente das existentes no fluxo de água externo (Playle e Wood, 1989; Randall e Wright, 1989; Gilmour, 1998).

A função que este revestimento mucoso desempenha ainda está por esclarecer. No entanto, julga-se que pode participar na defesa contra agentes patogénicos, na prevenção de fluxos de água turbulentos e na regulação osmótica ou iónica (Perry e Laurent, 1993). A produção e a libertação contínua de muco podem prevenir a fixação de organismos patogénicos. De facto, a presença de enzimas bacteriolíticas, de anticorpos e a detecção da actividade da lisozima na superfície mucosa, indica uma função protectora. Importa referir a capacidade que o muco possui para coagular e precipitar partículas em suspensão fornecendo, desta forma, protecção a tecidos delicados como é o caso do epitélio branquial (Lock e Overbeeke, 1981).

Apesar de, provavelmente, o muco não ser uma barreira significativa para a difusão de electrólitos, um aumento da camada mucosa do epitélio pode ser vantajoso, tendo em conta a capacidade do muco para ligar iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (Handy, 1989). Assim, a camada mucosa, rica em  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , próxima do epitélio branquial, pode impedir a saída destes iões por difusão passiva e, facilitar a sua absorção (Perry e Laurent, 1993). Uma secreção excessiva de muco pode, contudo, dificultar as trocas gasosas e iónicas com o meio externo, devido ao aumento da espessura da barreira respiratória. Um compromisso estrutural e funcional deverá, portanto, ser estabelecido, para que as exigências em oxigénio e electrólitos sejam supridas, sem descurar a sua acção protectora, em especial, aquando da exposição em águas poluídas deficientes em oxigénio (Maina, 1990).

### **E. Células neuroepiteliais**

As células neuroepiteliais existentes no epitélio do filamento branquial foram descritas pela primeira vez por Dunel *et al.* (1982). Estes autores referem que estas células se encontram ao longo do comprimento dos filamentos, sem excepção, não tendo sido detectada nenhuma distribuição particular. No entanto, Bailly *et al.* (1992) referem que a maioria das células neuroepiteliais se concentra na metade distal do filamento, de modo isolado, ou em grupo. De acordo com Dunel *et al.* (1982), este tipo celular está localizado na camada mais profunda do epitélio filamentar e nunca atinge a superfície epitelial externa. Contudo, Zacccone *et al.* (1996) detectaram, por imuno-reactividade com neuropéptidos e algumas

proteínas de ligação ao cálcio, células neuroepiteliais cuja região apical se encontrava localizada na superfície epitelial, em contacto com a água. As células neuroepiteliais emitem um maior ou menor número de processos em todas as direcções, em particular na direcção da lâmina basal do epitélio filamentar. Agregados de vesículas de conteúdo granular podem ser vistos no pólo basal e nos referidos processos. Estes, correm tortuosamente entre as células epiteliais e alguns contactam com a lâmina basal do epitélio ou com uma célula neuroepitelial vizinha (Bailly *et al.*, 1992).

As células neuroepiteliais apresentam características comuns às suas homónimas descritas na parede do tracto respiratório de mamíferos. Tratam-se de células facilmente reconhecíveis pela sua localização na lâmina basal e pelas características morfológicas, em particular por um citoplasma claro e um núcleo grande, redondo e eucromático (Dunel *et al.*, 1994). Caracterizam-se, ainda, pela presença de vesículas de conteúdo denso dispersas por todo o citoplasma. No entanto, em muitos casos, verifica-se uma acumulação destas vesículas numa parte da célula, em íntimo contacto com a lâmina basal, sugerindo a existência de uma determinada polaridade. Zaccone *et al.* (1997), referem ainda a possível existência de dois tipos de células neuroepiteliais, classificadas de acordo com o tipo de grânulos ou vesículas citoplasmáticas. Um tipo A, possuidor de grânulos pleiomórficos representando, provavelmente, diferentes estádios de maturação, e um tipo B, que contém uma mistura de grânulos arredondados, grandes e pequenos. Os grânulos ou vesículas citoplasmáticas, por vezes, sofrem exocitose, com o seu conteúdo a ser observado na parte externa da membrana celular, apoiado sobre a membrana basal. Embora a ultraestrutura das células neuroepiteliais varie com a espécie (Dunel e Laurent, 1980; Laurent, 1982, 1984), é usual a presença de um número elevado de organelos citoplasmáticos, o que indica uma taxa metabólica elevada, presumivelmente, associada com a formação das vesículas densas.

A característica mais significativa destas células reside na sua enervação. Existe uma rede nervosa localizada no parênquima subepitelial, com neurónios de vários tamanhos, a maioria dos quais sem bainha de mielina. Destes saem prolongamentos em direcção à membrana basal. Próximo das células neuroepiteliais, atravessam a membrana basal e ligam-se àquelas. A situação oposta é observada apenas ocasionalmente (Laurent, 1982, 1984; Dunel *et al.*, 1994). Após atravessarem a membrana basal, as fibras nervosas entram em contacto com as células neuroepiteliais. Frequentemente, pode-se observar mais de um perfil aposto à mesma célula, o que indica que vários nervos estão

relacionados com uma única célula. Os perfis terminais em contacto com as células são de dois tipos. No primeiro caso, são pequenos e possuem uma população densa de vesículas claras e poucas vesículas densamente coradas. O segundo tipo é constituído por neurónios grandes com poucos organelos, algumas vesículas densamente coradas e mitocôndrias grandes. Segundo Bailly *et al.* (1992), um destes tipos é, provavelmente, constituído por nervos branquiais, simpáticos, catecolaminérgicos. A segunda enervação das células neuroepiteliais deriva dos neurónios cujo mediador químico é a serotonina. Em ambos os casos, a acumulação de vesículas densamente coradas na extremidade celular que encara o perfil nervoso, sugere a existência de relações sinápticas. Nestas regiões, a membrana é mais densa e suportada por um material ondulado na face citosólica (Dunel *et al.*, 1980).

Nas células neuroepiteliais a serotonina está concentrada em vesículas de conteúdo granular. Dado que a maioria destas vesículas é exocitada sobre a lâmina basal, a serotonina libertada parece ter alvos epiteliais e subepiteliais: células musculares lisas, vasculares e não vasculares, células endoteliais, fibrócitos e plexos nervosos (Dunel *et al.*, 1982; Laurent, 1984).

Como já foi referido, a maioria das células neuroepiteliais encontra-se na metade distal do filamento, em áreas favoráveis para a monitorização da concentração de oxigénio na água e no sangue (Zaccone *et al.*, 1997). Em contraste, os neurónios de serotonina, quando presentes, estão concentrados na porção proximal daquele. Na metade distal, as fibras nervosas dependentes da serotonina cursam por baixo das células neuroepiteliais mas não enervam o sistema vascular eferente nem o epitélio do filamento, o qual se aproxima mais das células neuroepiteliais. Esta distribuição particular das duas fontes de serotonina, exerce uma acção vasomotora sobre a vasculatura eferente do filamento, cuja perfusão pode ser modulada pela serotonina dos neurónios, na metade proximal do filamento, e das células neuroepiteliais, na metade distal (Bailly *et al.*, 1992). Do mesmo modo, a função osmoregulatória da brânquia também pode ser modulada por mecanismos dependentes da serotonina (Laurent e Dunel, 1980) e no metabolismo do cálcio. Contudo, a elucidação das funções exactas destas células permanece um desafio para os investigadores.

#### **F. Células indiferenciadas**

Vários autores fazem referência à presença de células indiferenciadas na região basal do epitélio filamentar estratificado (Dunel e Laurent, 1980; Laurent, 1982, 1984). Estas células são caracterizadas pela presença de um elevado rácio

núcleo: citoplasma e por possuírem características comuns às células pavimentosas (retículo endoplasmático rugoso, lisossomas, vesículas e vacúolos). Contudo, comparativamente às células pavimentosas, as indiferenciadas possuem um número mais elevado de ribossomas livres (Wilson e Laurent, 2002). Especula-se, que será este o tipo celular que, por diferenciação, irá dar origem às células mais superficiais, nomeadamente, pavimentosas e de cloro.

### G. Outros tipos celulares

Adicionalmente aos tipos celulares descritos acima, estão ainda presentes no epitélio filamental, ainda que em menor número, células eosinofílicas granulares e “rodlet cells”. As células eosinofílicas podem ser homólogas aos mastócitos dos mamíferos. Apresentam grânulos PAS negativos e alguma imuno-recatividade com o anticorpo monoclonal 21G6, que parece reagir com os leucócitos da truta. O segundo tipo celular mencionado, possui uma cápsula bem definida e bastonetes intracelulares que aparentam ter origem parasitária (Wilson e Laurent, 2002).

### EPITÉLIO LAMELAR

A lamela consiste numa linha de capilares, delimitada de ambos os lados por um epitélio, o qual está ancorado nas células pilar, cujos prolongamentos citoplasmáticos formam o endotélio. O epitélio da lamela secundária tem uma estrutura semelhante nos diferentes tipos de peixes (Fig. 2). Repousa na lâmina basal das células pilar, sendo constituído por duas camadas celulares separadas por amplos espaços extracelulares, os quais podem, em determinados locais, ser

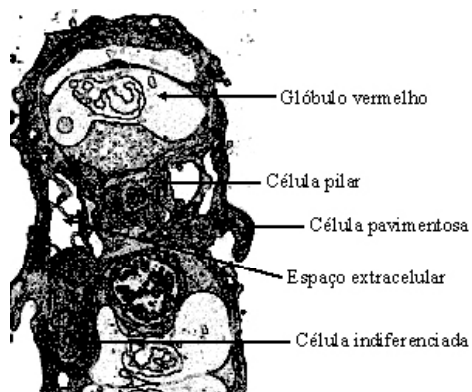


Figura 2. Esquema representativo do epitélio lamelar, porção terminal de uma lamela.

suficientemente grandes para conter linfócitos. Estes espaços extracelulares comunicam com os espaços correspondentes do epitélio filamental, característica que pode ter implicações importantes na consideração dos movimentos dos fluidos transbranquiais, drenando, possivelmente, para a vasculatura de menor pressão

(Dunel e Laurent, 1980; Laurent, 1982, 1984). A camada mais externa, também denominada mucosa, é caracterizada pelas suas células pavimentosas, a mais interna ou serosa, é caracterizada pela presença de células indiferenciadas.

### **A. Células pilar**

As células pilar são uma característica fundamental dos capilares da brânquia. São endoteliais na sua função, dado delimitarem esta região do compartimento sanguíneo. Como foi sugerido, de acordo com a sua situação podem contrair-se ou dilatar-se e, desta forma, provocar alterações significativas no fluxo sanguíneo lamelar (Robertson e Hazel, 1998). Estruturalmente, possuem feixes de filamentos de actomiosina, os quais, quando contraídos, podem reduzir o diâmetro do lúmen. Adicionalmente, são reforçadas por colunas de colagénio que funcionam como barras de deslizamento (Bettex-Galland e Hugues, 1973). Estas células não são enervadas e a sua activação por agonistas adrenérgicos e colinérgicos ainda está sob investigação (Laurent e Dunel, 1980; Laurent, 1984). Em suma, o significado funcional das células pilar e do seu aparelho contráctil pode ser considerado na perspectiva de um controlo miogénico autorregulador, de acordo com o qual os miofilamentos contrácteis são fundamentalmente activados por alterações rápidas na pressão sanguínea do que por factores neuro-humorais. Uma outra função possível das células pilar foi revelada pela demonstração de fagocitose nas células pilar em truta arco-íris, *O. mykiss*, e pelo seu envolvimento em infecções virais (Dunel e Laurent, 1980; Laurent, 1982, 1984).

### **B. Células pavimentosas**

A camada mucosa do epitélio lamelar é caracterizada pelas suas células pavimentosas, as quais são altamente diferenciadas, dado possuírem um aparelho de Golgi bem desenvolvido, um retículo endoplasmático rugoso abundante e vesículas de vários tamanhos. Estas características sugerem uma actividade celular importante, de significado funcional ainda desconhecido. Entre as suas propriedades específicas, o epitélio da lamela tem de ser tão permeável quanto possível aos gases e ter uma perfusão relativamente menor aos iões e à água, em especial, nos peixes de água salgada. Devido à extensão da área superficial ocupada pelo epitélio lamelar, estas células contribuem, provavelmente, para a maior parte dos processos de permeabilidade passiva. Até ao presente, não há

evidência de que condições externas diferentes conduzam a alterações na ultraestrutura deste epitélio. No entanto, o rearranjo das moléculas fosfolipídicas da membrana provoca uma alteração na permeabilidade do epitélio. Por outro lado, a permeabilidade da brânquia pode ser afectada pela composição do revestimento celular externo da superfície epitelial (Laurent, 1982). Este revestimento pode ser secretado pelas células mucosas distantes (mucopolissacáridos ácidos), ou pelas células pavimentosas do próprio local, como é sugerido pela presença de numerosas vesículas concentradas próximo da membrana apical e pelas frequentes figuras de exocitose (Dunel e Laurent, 1980; Laurent, 1982, 1984).

### **C. Células indiferenciadas**

A camada serosa é constituída por células não diferenciadas. No entanto, a presença de numerosos ribossomas e de retículo endoplasmático rugoso sugere que algumas destas células se encontram em diferenciação. Determinadas observações sugerem ainda que, em certas condições, este tipo celular se desenvolve e dá origem a células de cloro, embora estas, em geral, se desenvolvam no epitélio filamentar. Estas circunstâncias parecem estar relacionadas com condições anormais que induzem uma perda aguda de iões. Assim, nestas condições, ocorre um desenvolvimento exagerado de células de cloro no epitélio lamelar, as quais fornecem, presumivelmente, um mecanismo compensatório para aumentar a captação iónica.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AVELLA, M. e BORNANCIN, M., 1989. A new analysis of ammonia e sodium transport through the gills of the freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Exp. Biol. 142: 155-175.
- AVELLA, M., MASONI, A., BORNANCIN, M. e MAYER-GOSTAN, N., 1987. Gill morphology e sodium influx in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) acclimated to artificial freshwater environments. J. Exp. Zool., 241: 159-169.
- BAILLY, Y., DUNEL, S. e LAURENT, P., 1992. The neuroepithelial cells of the fish gill filament – indolamine – immunocytochemistry e innervation. Anat. Rec., 233: 143-161.
- BAKER, J.T.P., 1969. Histological e electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). J. Fish. Res. Bd. Can., 26: 2785-2793.
- BETTEX-GALLAND, M. e HUGHES, G. M., 1973. Contractile filamentous material in pillar cells of fish gills. J. Cell. Sci., 13: 359-370.
- BONE, Q. e MARSHALL, N.B., 1982. Biology of Fishes. Blackie & Son Limited, London, 253 p.
- CHRÉTIEN, M. e PISAM, M., 1986. Cell renewal e differentiation in the gill epithelium of fresh- or salt-water-adapted euryhaline fish as revealed by [<sup>3</sup>H]-thymidine radioautography. Biol. Cell, 56: 137-150.

- CIONI, C., MERICH, D., CATALDI, E. e CATAUDELLA, S., 1991. Fine structure of chloride cells in freshwater- e seawater-adapted *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) e *Oreochromis mossambicus* (Peters). J. Fish Biol., 39: 197-209.
- COPELAND, D.E., 1948. The cytological basis of chloride transfer in the gills of *Fundulus heteroclitus*. J. Morphol., 82: 201-228.
- DABORN, K., COZZI, R.R.F. e MARSHALL, W. S., 2001. Dynamics of pavement cell? Chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. J. Exp. Biol., 204: 1889-1899.
- DUNEL, S., BAILLY, Y. e LAURENT P. 1982. Neuroepithelial cells in fish gill primary lamellae. J. Appl. Physiol., 53: 1432-1453.
- DUNEL, S., BAILLY, Y. e LAURENT P., 1980. Neurons controlling the gill vasculature in five species of teleost. Cell Tissue Res., 255: 567-573.
- DUNEL, S., CHEVALIER, C. e LAURENT, P., 1994. Distribution of neuroepithelial cells e neurons in the trout gill filament: comparison in spring e winter. Can. J. Zool., 72: 1794-1799.
- DUNEL, S. e LAURENT, P., 1973. Ultrastructure comparée de la pseudobranchie chez les téléostéens marins et d'eau douce. J. Microsc., 16: 53-74.
- DUNEL, S. e LAURENT, P., 1980a. Functional organization of the gill vasculature in different classes of fish. In: Lahlou, B. (ed). Epithelial transport in lower vertebrates. Cambridge University Press, pp. 37-58.
- DUNEL, S. e LAURENT, P., 1980b. Ultrastructure of marine teleost gill epithelia: SEM e TEM study of the chloride cell apical membrane. J. Morphol., 165: 175-186.
- EPSTEIN, F.H., SILVA, P. e GOSS, G., 1980. Role of Na-K-ATPase in chloride cell function. Am. J. Physiol., 238: R246-R250.
- EVANS, D.H., PIERMARINI, P.M. e POTTS, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. J. Exp. Zool., 283: 641-652.
- FISHELSON, L., 1980. Scanning e transmission electron microscopy of the squamose gill-filament epithelium from fresh e seawater adapted Tilapia. Environ. Biol. Fish., 5: 161-165.
- FLIK, G. e VERBOST, P.M., 1993. Calcium transport in fish gills e intestine. J. Exp. Biol., 184: 17-29.
- FOSKETT, J.K. e SCHEFFEY, C., 1982. The chloride cell: Definitive identification as the salt secretory cell in teleosts. Science, 215: 164-166.
- GILMOUR, K.M., 1998. Gas exchange. In: D.H. Evans (ed.), The Physiology of Fishes. CRC Press, Boca Raton, London, pp. 101-128.
- GIRARD, J.P. e PAYAN, P., 1980. Ion exchanges through respiratory e chloride cells in freshwater e seawater adapted teleosts. Am. J. Physiol., 238: R260-268.
- GOSS, G.G., LAURENT, P. e PERRY, S.F., 1992b. Evidence for a morphological component in acid-base regulation during environmental hypercapnia in the brown bulhead (*Ictalurus nebulosus*). Cell Tissue Res., 268: 539-552.
- GOSS, G.G., LAURENT, P. e PERRY, S.F., 1994a. Gill morphology during hypercapnia in brown bulhead (*Ictalurus nebulosus*): role of chloride cells e pavement cells in acid-base regulation. J. Fish Biol., 45: 705-718.
- GOSS, G.G., PERRY, S.F., FRYER, J.N. e LAURENT, P., 1998. Gill morphology e acid-base regulation in freshwater fishes. Comp. Biochem. Physiol., 119A: 107-115.
- GOSS, G.G., PERRY, S.F. e LAURENT, P., 1995. Ultrastructural e morphometric studies on ion e acid-base transport processes in freshwater fishes. In: C.O.M. Wood e T.J. Shuttleworth (ed.), Cellular e Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation. Fish Physiology. San Diego: Academic Press, pp 257-284.

- GOSS, G.G., PERRY, S.F., WOOD, C.M. e LAURENT, P., 1992 a. Mechanisms of ion e acid-base regulation at the gills of freshwater fish. J. Exp. Zool., 263: 143-159.
- GOSS, G.G., WOOD, C.M., LAURENT, P. e PERRY, S.F., 1994b. Morphological responses of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill to hyperoxia, base ( $\text{NaHCO}_3$ ) e acid ( $\text{HCl}$ ) infusions. Fish Physiol. Biochem., 12: 465-477.
- HANDY, R.D., 1989. The ionic composition of rainbow trout body mucus. Comp. Biochem. Physiol., 93(A): 571-575.
- HOOTMAN, S.R. e PHILPOTT, C.W., 1980. Accessory cells in teleost branchial epithelium. Am J. Physiol., 238: R199-R206.
- HOSSLER, F.E., MUSIL, G., KARNAKY, K.J.J. e EPSTEIN, F.H., 1985. Surface ultrastructure of the gill arch of the Killifish, *Fundulus heteroclitus*, from seawater e freshwater, with special reference to the morphology of the apical crypts of the chloride cells. J. Morphol., 185: 377-386.
- HUGHES, C.M., 1984. General anatomy of the gills In: W.S. Hoar e D.J. Randall, Fish Physiology. Academic Press, New York, pp. 1-72.
- HWANG, P.P., 1988a. Multicellular complex of chloride cells in the gills of freshwater teleosts. J. Morphol., 196: 15-22.
- HWANG, P.P., 1988b. Ultrastructural study on multicellular complex of chloride cells in teleosts. Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica 27: 225-233.
- JÜRSS, K. e BASTROP, R., 1995. The function of mitochondria-rich cells (chloride cells) in teleost gills. Rev. Fish Biol. Fisheries, 5: 235-255.
- KARNAKY, K.J., 1986. Structure e function of the chloride cell of *Fundulus heteroclitus* e other teleosts. Am. Zool., 26: 209-224.
- KESSEL, F.G. e BEAMS, H.W., 1962. Electron microscope studies on gill filaments of *Fundulus heteroclitus* from sea water e fresh water with special reference to the ultrastructural organization of the "chloride cell". J. Ultrastruct. Res., 6: 77-87.
- KEYS, A. e WILLMER, E.N., 1932. "Chloride secreting cells" in the gills of fishes, with special reference to the common eel. J. Physiol., 76: 368-378.
- KING, J.A.C. e HOSSLER, F.E., 1991. The gill arch of the striped bass, *Morone saxatilis*. IV. Alterations in the ultrastructure of chloride cell apical crypts e chloride efflux following exposure to seawater. J. Morphol., 209: 165-176.
- KÜLTZ D., JÜRSS, K. e JONAS, L., 1995. Cellular e epithelial adjustments to altered salinity in the gill e opercular epithelium of cichlid fish (*Oreochromis mossambicus*). Cell Tissue Res., 279: 65-73.
- LAURENT, P., 1982. Structure of vertebrate gills In: D.F. Houlihan, J.C. Rankin e T.J. Shuttleworth (Eds), Gills. Vail Ballou Press Inc., New York.
- LAURENT, P., 1984. Gill internal morphology In: W.S. Hoar e D.J. Randall, Fish Physiology, Academic Press, New York, pp. 73-183.
- LAURENT, P. e DUNEL, S., 1980. Morphology of gill epithelia in fish. Am. J. Physiol., 238: R147-159.
- LAURENT, P., MAINA, J.N., BERGMAN, H.L., NARAHARA, A., WALSH, P.J. e WOOD, C.M., 1995. Gill structure of a fish from an alkaline lake: Effect of short-term exposure to neutral conditions. Can. J. Zool., 73: 1170-1181.
- LAURENT, P. e PERRY, S.F., 1990. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology e ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. Cell Tissue Res., 259: 429-442.
- LAURENT, P. e PERRY, S.F., 1991. Environmental effects on fish gill morphology. Physiol. Zool., 53: 4-25.



- LEE, T.H., HWANG, P.P., LIN, H.C. e HUANG, F.L., 1996 a. Mitochondria-rich cells in the branchial epithelium of the teleost, *Oreochromis mossambicus*, acclimated to various hypotonic environments. *Fish Physiol. Biochem.*, 15(6): 513-523.
- LEE, T.H., HWANG, P.P. e FENG, S.H., 1996b. Morphological studies of gill e mitochondria-rich cells in the stenohaline cyprinid teleosts, *Cyprinus carpio* e *Carassius auratus*, adapted to various hypotonic environments. *Zool. Stud.*, 35(4): 272-278.
- LIN, H., PFEIFFER, D., VOGL, A., PAN, J. e RANDALL, D., 1994. Immunolocalization of H<sup>+</sup>-ATPase in the gill epithelia of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 195(1): 169-183.
- LIN, H. e RANDALL, D.J., 1993. H<sup>+</sup>-ATPase activity in crude homogenates of fish gill tissue: inhibitor sensitivity e environmental e hormonal regulation. *J. Exp. Biol.*, 180: 163-174.
- LOCK, L.A. e OVERBEEKE, A.P., 1981. Effects of mercuric chloride e methylmercuric chloride on mucus secretion in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69(C): 67-73.
- MAINA, J.N., 1990. A study of the morphology of the gills of an extreme alkalinity e hyperosmotic adapted teleost *Oreochromis alcalicus* (Boulenger) with particular emphasis on the ultrastructure of the chloride cells e their modifications with water dilution: a SEM e TEM study. *Anatomy & Embriology*, 183: 83-98.
- MARSHALL, W.S., 2002. Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *J. Exp. Zool.*, 293: 264-283.
- MORGAN, I.J., POTTS, W.T.W. e OATES, K., 1994. Intracellular ion concentrations in branchial epithelial cells of brown trout (*Salmo trutta* L.) determined by x-ray microanalysis. *J. Exp. Biol.*, 194: 139-151.
- PAYAN, P., GIRARD, J.P. e MAYER-GOSTAN, N., 1984. Branchial ion movements in teleosts, the role of respiratory e chloride cells. In: W.S. Hoar e D.J. Randall (Eds), *Fish Physiology*. Academic Press, Orlando, pp. 39-63.
- PERRY, S.F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.*, 59: 325-347.
- PERRY, S.F. e FLIK, G., 1988. Characterization of branchial transepithelial calcium fluxes in freshwater trout (*Salmo gairdneri*). *Am. J. Physiol.*, 254: R491-498.
- PERRY, S.F. e FRYER, J.N., 1997. Proton pumps in the fish gill e kidney. *Fish Physiol. Biochem.*, 17: 363-369.
- PERRY, S.F., GOSS, G.G. e FENWICK, J.C., 1992a. Interrelationships between gill chloride cell morphology e calcium uptake in freshwater teleosts. *Fish Physiol. Biochem.*, 10: 327-337.
- PERRY, S.F., GOSS, G.G. e LAURENT, P., 1992b. The interrelationships between gill chloride cell morphology e ionic uptake in four freshwater teleosts. *Can. J. Zool.*, 70: 1775-1786.
- PERRY, S.F. e LAURENT, P., 1989. Adaptational responses of rainbow trout to lowered external NaCl concentration: contribution of the branchial chloride cell. *J. Exp. Biol.*, 147: 147-168.
- PERRY, S.F. e LAURENT, P., 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In: J. C. Jensen e F.B. Rankin (Eds), *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London, pp.231-264.
- PIIPER, J., 1998. Branchial gas transfer models. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119A: 125-130.
- PISAM, M., AUPERIN, B., PRUNET, P., RENTIER-DELRUE, F., MARTIAL, J. e RAMBOURG, A., 1993. Effects of prolactin on a e b chloride cells in the gill epithelium of the saltwater adapted tilapia *Oreochromis niloticus*. *Anat. Rec.*, 235: 275-284.
- PISAM, M., CAROFF, A. e RAMBOURG, A., 1987. Two types of chloride cells in the gill epithelium of a freshwater-adapted euryhaline fish: *Lebistes reticulatus*; their modifications during adaptation to saltwater. *Am. J. Anat.*, 179: 40-50.

- PISAM, M., LE MOAL, C., AUPERIN, B., PRUNET, P. e RAMBOURG, A., 1995. Apical structures of "mitochondria-rich"  $\alpha$  e  $\beta$  cells in euryhaline fish gill: their behaviour in various living conditions. *Anat. Rec.*, 241: 13-24.
- PISAM, M., PRUNET, P. e RAMBOURG, A., 1989. Accessory cells in the gill epithelium of the freshwater rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Am. J. Anat.*, 184: 311-320.
- PISAM, M. e RAMBOURG, A., 1991. Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. *Int. Rev. Cytol.*, 130: 191-232.
- PISAM, M., SARDET, C. e MAETZ, J., 1980. Polysaccharidic material in chloride cell of teleostean gill: modifications according to salinity. *Am. J. Physiol.*, 238: R213-218.
- PLAYLE, R.C. e WOOD, C.M., 1989. Water chemistry changes in the gill microenvironment of rainbow trout: experimental observations e theory. *J. Comp. Physiol.*, 159: 527-537.
- RANDALL, D.J. e BRAUNER, C., 1998. Interactions between ion e gas transfer in freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119A: 3-8.
- RANDALL, D. e WRIGHT, P. A., 1989. The interaction between carbon dioxide e ammonia excretion e water pH in fish. *Can. J. Zool.*, 67: 2936-3942.
- ROBERTSON, J.C. e HAZEL, J.R., 1998. 5'-Nucleotidase e alkaline phosphodiesterase activities in trout gill localize to endothelial (pillar) cells. *J. Exp. Biol.*, 201: 2011-2019.
- RONCERO, V., REDONDO, E., GAZQUEZ, A. e DURAN, E., 1990. Structural e ultrastructural differentiation of cell types in the gills of the tench (*Tinca tinca*, L.). *Anat. Histol. Embryol.*, 19: 236-244.
- SAKAMOTO, T., YOKOTA, S. e ANDO, M., 2000. Rapid morphological oscillation of mitochondrion rich cell in estuarine mudskipper following salinity changes. *J. Exp. Zool.*, 286: 666-669.
- SARDET, C., 1980. Freeze fracture of the gill epithelium of euryhaline teleost fish. *Am. J. Physiol.*, 238: R202-R212.
- SULLIVAN, G.V., FRYER, J. N. e PERRY, S.F., 1995. Immunolocalization of proton pumps ( $H^+$ -ATPase) in pavement cells of rainbow trout gill. *J. Exp. Biol.*, 198: 2619-2629.
- VARSAMOS, S., DIAZ, J.P., CHARMANTIER, G., FLIK, G., BLASCO, C. e CONNES, R., 2002. Branchial chloride cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to freshwater, seawater, and doubly concentrated sea water. *J. Exp. Zool.*, 293: 12-26.
- WENDELAAR BONGA, S.E., FLIK, G., BALM, P. H. e van der MEIJ, J.C., 1990. The ultrastructure of chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water. *Cell Tissue Res.*, 259: 575-585.
- WENDELAR BONGA, S.E. e van der MEIJ, J.C., 1989. Degeneration e death, by apoptosis e necrosis, of pavement e chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*. *Cell Tissue Res.*, 255:235-243.
- WHITE, F.N., 1977. Respiration. In: M. S. Gordon, G. A. Bartholomew, A. D. Grinnel, C. B. Jorgensen, F. N. White (eds.), *Animal Physiology: Principles e Adaptations*. Macmillan Publishing Co., Inc., New York, pp. 156-217.
- WILSON, J.M., IWATA, K., IWAMA, G.K. e RANDALL, D.J., 1998. Inhibition of ammonia excretion e production in rainbow trout during severe alkaline exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121B: 99-109.
- WILSON, J.M. e LAURENT, P., 2002. Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool.*, 293: 192-213.
- WILSON, J.M., RANDALL, D.J., DONOWITZ, M., VOGL, A.W. e IP, A.K., 2000. Immunolocalization of ion-transport proteins to branchial epithelium mitochondria-rich cells in the mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*). *J. Exp. Biol.*, 203: 2297-2310.

- WONG, C.K.C. e CHAN, D.K.O., 1999. Isolation of viable cell types from the gill epithelium of Japanese eel *Anguilla japonica*. Am. J. Physiol., 276: R363-372.
- WOOD, C.M., 1991. Branchial ion e acid-base transfer in freshwater teleost fish: environmental hyperoxia as a probe. Physiol. Zool., 64(1): 68-102.
- ZACCONE, G., FASULO, S., AINIS, L. e LICATA, A., 1997. Paraneurons in the gills and airways of fishes. Microsc. Res. Tech., 37(1): 4-12.
- ZACCONE, G., MAUCERI, A., FASULO, S., AINIS, L., LO CASCIO, P. e RICCA, M.B., 1996. Localization of immunoreactive endothelin in the neuroendocrine cells of fish gill. Neuropeptides, 30(1): 53-57.

## **EFFECTS OF FEEDING FABA BEANS (*VICIA FABA*), LUPINS (*LUPINUS ALBUS*) OR COWPEA (*VIGNA UNGUICULATA*) ON NITROGEN BALANCE AND DIGESTIVE PANCREATIC ENZYMES IN WEANLING PIGS**

J. A. PEREIRA <sup>(1)</sup> e J. P. BENGALA-FREIRE <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Univ. Algarve, Escola Superior de Tecnologia, Área Departamental de Eng<sup>a</sup> Alimentar, Campus da Penha, Estrada da Penha, 8000-117 Faro (japer@ualg.pt)

<sup>(2)</sup> Instituto Superior de Agronomia, Dept. de Produção Agrícola e Animal, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa

*(Aceite para publicação em 5 de Março de 2004)*

### **ABSTRACT**

Twenty four (Duroc x Landrace) piglets, aged 28 days, were distributed in six successive blocks of four piglets. They received one of the four experimental diets. In diets 2, 3 and 4, the faba beans, the lupins and the cowpea have replaced 30% of the basal diet, respectively. Faeces and urines were collected during a period of seven days for nitrogen balance measure and the pancreas were collected at slaughter. The cowpea reduced ( $P<0.01$ ) the daily weight gain by 35%. The feed conversion ratio was increased ( $P>0.10$ ) by 60% with the lupin and the cowpea diets. The nitrogen retained, in percentage of intake was reduced ( $P<0.01$ ) by 17 and 14 percentual units, and in percentage of absorbed was reduced by 12 percentual units by the cowpea and the lupin seeds, respectively. The cowpea increased the total and specific activities of amylase by 70 and 90% ( $P<0.05$ ) and those of lipase by 50 and 40% ( $P<0.05$ ). The lupins reduced ( $P<0.05$ ) the total activity of lipase by 60%. In conclusion, between these legume seeds, the faba bean was the most effective to be used in piglet's feeding.

**Key words:** Cowpea, digestive enzymes, faba beans, lupins, nitrogen balance, piglets

## **EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE FAVA (*VICIA FABA*), DE TREMOÇO (*LUPINUS ALBUS*) OU DE FEIJÃO FRADE (*VIGNA UNGUICULATA*) NA ALIMENTAÇÃO DO LEITÃO SOBRE O BALANÇO AZOTADO E A ACTIVIDADE DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DO PÂNCREAS**

### **RESUMO**

Vinte e quatro leitões (Duroc x Landrace) com 28 dias de idade, foram repartidos em 6 blocos de 4 animais e receberam um dos 4 regimes experimentais. Nos re-

gimes 2, 3 e 4, o regime base foi respectivamente substituído em 30% por sementes de fava miúda, de tremçoço branco doce ou de feijão frade. As fezes e as urinas foram recolhidas para a realização do balanço azotado e os pâncreas para análise das enzimas digestivas. O feijão frade reduziu ( $P<0,10$ ) em cerca de 35% o GMD dos leitões e os regimes em que se utilizou o tremçoço ou o feijão frade agravaram em 60% o IC ( $P>0,10$ ). O feijão frade e tremçoço originaram uma diminuição do coeficiente de utilização prático do azoto, respectivamente de 17 e 14 pontos percentuais ( $P<0,01$ ) e do coeficiente de retenção azotada de 12 pontos percentuais ( $P<0,01$ ). A actividade total e específica da amilase foi respectivamente estimulada em 70 e 90% ( $P<0,05$ ) e a lipase total e específica reduzida em 50 e 40% ( $P<0,05$ ) pelo feijão frade. O tremçoço reduziu a actividade total da lipase em 60% ( $P<0,05$ ). A fava miúda revelou-se a proteaginososa com melhores prespectivas para ser utilizada na alimentação do leitão.

**Palavras-chave:** Balanço azotado, enzimas digestivas, fava miúda, feijão frade, leitão, tremçoço

## INTRODUÇÃO

O sucesso do desmame precoce dos leitões, depende em grande medida da escolha de fontes proteicas apropriadas para a formulação do regime, as quais devem ser bem digeridas ao nível da parte proximal do tubo digestivo (Peiniau *et al.*, 1996), mas também assegurar o bom desenvolvimento da função digestiva do leitão. Relativamente a este aspecto, na alimentação do leitão, a incorporação de concentrado de proteína solúvel de peixe parece aumentar a actividade de algumas enzimas proteolíticas do pâncreas (Newport, 1979), enquanto a inclusão de concentrado de proteína de soja induz uma diminuição da síntese da quimotripsina pancreática (Leibholz, 1981).

Os grãos de proteaginosas, são matérias-primas com teores em proteína e em amido apreciáveis, contendo, à excepção do tremçoço, cerca de 25% de proteína bruta e um teor em amido da ordem dos 40% na matéria seca (Sauvant *et al.*, 2002). Relativamente à qualidade da proteína, as proteaginosas são ricas em lisina, mas deficitárias em aminoácidos sulfurados, constituindo assim um bom complemento à proteína dos cereais. Contudo, o valor azotado dos grãos de proteaginosas é limitado pela presença de factores antinutricionais (FAN) susceptíveis de interferirem com o processo digestivo dos animais monogástricos (Liener, 1990), reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais e aumentando as perdas endógenas de azoto (Jansman *et al.*, 1995). No tremçoço branco, os principais FAN responsáveis pela menor utilização digestiva desta proteaginososa pelos suínos são os alfa-galactósidos (Gdala, 1998; Van Barneveld, 1999) e o seu teor de fibra (Mcniven e Castel, 1995). Relativamente ao feijão

frade, a ocorrência de inibidores de proteases (Umapathy *et al.*, 1999), de alfa-galactósidos (verbascose, estaquiose e rafinose) e de taninos (Makinde *et al.*, 1996) é associada ao menor crescimento observado no leitão. Na fava, os taninos constituem os principais FAN implicados na menor utilização digestiva desta proteagínosa pelo leitão (Van der Poel *et al.*, 1992; Jansman *et al.*, 1995) e pelos suínos em crescimento (20-35kg) (Grala *et al.*, 1993).

Neste trabalho pretendeu-se estudar o efeito da utilização de 30% de sementes de diferentes proteagínosas (fava miúda, tremço branco doce ou feijão frade) no regime alimentar de desmame do leitão sobre o balanço azotado e a actividade das enzimas digestivas do pâncreas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo do efeito da utilização da fava miúda, do tremço branco doce ou do feijão frade no regime de desmame, utilizaram-se 24 leitões (machos) cruzados (Duroc x Landrace) desmamados aos 28 dias de idade. Os leitões foram repartidos em 6 blocos de 4 animais em função do peso vivo e da ninhada e foi-lhes distribuída a mesma quantidade de um dos 4 regimes experimentais abaixo descritos, distribuídos sob a forma de granulado (3mm de diâmetro). Os leitões foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, equipadas com tabuleiros em inox de forma a permitir a recolha separada de fezes e urinas. Após um período de quatro dias de adaptação aos regimes, seguiu-se um período de 7 dias de recolhas de fezes e urinas para a realização do balanço azotado, com pesagem dos animais no início e no final do período. A ingestão de alimento foi controlada diariamente através da pesagem individual do alimento distribuído e da recolha e pesagem do alimento refugado. No final do ensaio os leitões foram pesados e abatidos sob anestesia. Ao abate foi efectuada a recolha dos pâncreas dos animais, com congelação imediata em azoto líquido e posterior conservação a -70 °C até análise das enzimas digestivas.

O regime 1 foi formulado obedecendo às recomendações do INRA (1984) para os regimes de 1ª idade dos leitões (Quadro II), sendo esta formulação baseada no valor médio dos resultados analíticos de duas amostras das matérias-primas utilizadas no seu fabrico. Os regimes 2, 3 e 4 foram preparados incorporando respectivamente 30% de fava miúda (*Vicia faba*; variedade com baixo teor de taninos), de tremço branco doce (*Lupinus albus*) ou de feijão frade (*Vigna unguiculata*). A composição química das sementes de proteagínosas utilizadas nos regimes 2, 3 e 4 é apresentada no Quadro I.

QUADRO I - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS DE PROTEAGINOSAS ESTUDADOS.

	Fava miçuda ( <i>Vicia faba</i> )	Tremoço branco doce ( <i>Lupinus albus</i> )	Feijão frade ( <i>Vigna unguiculata</i> )
Matéria seca (%)	86,74	91,88	90,59
Cinzas (%MS)	3,24	3,55	4,36
Proteína Bruta (%MS)	29,51	36,90	23,18
Amido (%MS)	41,27	-	47,36
NDF (%MS)	12,17	23,04	10,30
ADF (%MS)	7,95	16,68	3,71
ADL (%MS)	1,28	1,67	1,32

QUADRO II - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E QUÍMICA DOS REGIMES EXPERIMENTAIS.

	Regime 1 (Regime base)	Regime 2 (Fava miçuda)	Regime 3 (Tremoço branco)	Regime 4 (Feijão frade)
Composição centesimal				
Cevada	40,30	26,80	26,80	26,80
Amido de milho	20,00	14,00	14,00	14,00
Farinha de peixe	10,00	7,00	7,00	7,00
Proteína de batata	10,00	7,00	7,00	7,00
Leite em pó	10,00	7,00	7,00	7,00
Óleo de soja	5,00	3,50	3,50	3,50
Fava miçuda	-	30,00	-	-
Tremoço branco doce	-	-	30,00	-
Feijão frade	-	-	-	30,00
CaCO <sub>3</sub>	0,70	0,70	0,70	0,70
CaHPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	2,50	2,50	2,50	2,50
NaCl	0,50	0,50	0,50	0,50
Pré-mistura (1)	1,00	1,00	1,00	1,00
Composição química				
Matéria Seca (%)	91,02	90,42	91,42	90,78
Cinzas (%MS)	7,08	7,38	7,37	7,61
Proteína Bruta (%MS)	22,99	24,08	27,20	23,02
Amido (%MS)	35,82	39,49	28,33	37,89
NDF (%MS)	9,50	11,61	13,71	9,10
ADF (%MS)	2,67	4,42	5,54	2,46
ADL (%MS)	0,86	1,12	0,98	0,87

(1) Para composição ver Pereira *et al.* (1999).

As fezes e urinas foram recolhidas diariamente e conservadas no frio (-18 °C). No final de cada período de recolhas prepararam-se amostras representativas das fezes e das urinas as quais foram liofilizadas. As amostras das proteaginosas, dos regimes e das fezes liofilizadas foram moídas num moinho Retch 5657 (Haan,

Alemanha) com crivo de 1,0 mm para análise química. A matéria seca (MS) foi doseada por secagem em estufa a 105 °C até peso constante e as cinzas por incineração completa a 550 °C durante uma noite. O azoto dos regimes, das fezes e das urinas foi determinado pelo método de Kjeldahl. Nas sementes de proteaginosas e nos regimes, as fracções NDF, ADF e ADL foram determinadas pelo método de Van Soest *et al.* (1991), o amido pelo método de Thivend *et al.* (1965).

No tecido pancreático, a proteína total foi doseada de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951), a amilase, a lipase, tripsina e quimotripsina pancreáticas foram doseadas segundo os métodos referenciados por Bengala Freire *et al.* (1991).

Os resultados das performances zootécnicas, do balanço azotado e da actividade das enzimas digestivas foram comparados por análise de variância de acordo com um desenho em blocos completos. Sempre que os valores de F da análise de variância foram significativos as médias dos regimes foram comparadas pelo teste de Duncan. Utilizou-se o programa SAS, procedimento GLM, para a realização das análises estatísticas (SAS, 1989).

## RESULTADOS

### Actividade das enzimas digestivas do pâncreas

A actividade total (UI/g tecido) e específica (UI/mg proteína) das enzimas digestivas do pâncreas é apresentada no Quadro III. O regime alimentar exerceu um efeito significativo ( $P < 0,05$ ) sobre a actividade total e específica da amilase e da lipase e verificou-se uma tendência ( $P < 0,10$ ) para fazer variar a actividade total da tripsina. A actividade total e específica da amilase foi, respectivamente, estimulada ( $P < 0,05$ ) em 70 e 90% pelo regime em que o feijão frade constituiu a principal fonte proteica. Pelo contrário, o feijão frade reduziu em cerca de 50 e 40% a actividade total e específica da lipase. Da mesma forma a inclusão de 30% de tremçoço branco doce reduziu ( $P < 0,05$ ) a actividade total da lipase. A actividade total da tripsina foi respectivamente reduzida ( $P < 0,10$ ) em cerca de 35 e 45% pelas sementes da fava e do tremçoço.

### O crescimento e o balanço azotado dos leitões

As performances zootécnicas e os resultados do balanço azotado dos leitões são apresentados no Quadro IV. Os leitões ingeriram em média 300 g de alimento por dia com um aumento de peso de cerca de 140 g/dia ( $P > 0,05$ ).



QUADRO III- EFEITO DAS SEMENTES DE PROTEAGINOSAS NA ACTIVIDADE TOTAL (T) (UI/g TECIDO) E ESPECÍFICA (E) (UI/mg PROTEÍNA) DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DO PÂNCREAS.

		Regime Base	Fava	Tremoço branco	Feijão frade	Análise Estatística		(1)
						N	R	DPR
Amilase	(T)	102458 <sup>a</sup>	137067 <sup>ab</sup>	74107 <sup>a</sup>	179992 <sup>b</sup>	NS	*	5159
	(E)	522 <sup>a</sup>	835 <sup>ab</sup>	490 <sup>a</sup>	1009 <sup>b</sup>	NS	*	289
Lipase	(T)	11230 <sup>a</sup>	9653 <sup>ab</sup>	6759 <sup>b</sup>	5773 <sup>b</sup>	NS	*	3175
	(E)	55,9 <sup>a</sup>	58,1 <sup>a</sup>	42,3 <sup>ab</sup>	32,0 <sup>b</sup>	•	*	15,0
Tripsina	(T)	1046	670	590	939	NS	•	308
	(E)	5,21	4,11	4,00	5,60	NS	NS	2,18
Quimotripsina	(T)	706	736	534	692	NS	NS	218
	(E)	3,52	4,26	3,33	4,02	NS	NS	1,10
Proteínas (mg/g tecido)		202	174	152	179	NS	NS	41

<sup>1)</sup> Efeitos: N: ninhada; R: regime; \*:  $P < 0,05$ ;  $\hat{\uparrow}$ :  $P < 0,10$ ; NS: não significativo, DPR: desvio padrão residual. a, b: Na mesma linha os valores afectados por uma mesma letra não são significativamente diferentes a  $P < 0,05$ .

Os resultados do balanço azotado respeitam à análise de variância da quantidade de azoto ingerido, retido e excretado na urina expressas em g/dia e g/dia/kg de peso vivo, do coeficiente de utilização prático do azoto (CUPN) e do coeficiente de retenção azotada (CRN).

A composição do regime de desmame não afectou significativamente a ingestão diária de azoto expressa em g/dia ou em g/dia/kg de peso vivo. No entanto, para um mesmo nível de ingestão de azoto, o regime com tremoço degradou significativamente o conjunto dos parâmetros do balanço azotado dos leitões (Quadro IV). Assim, este regime apresentou, relativamente ao regime base, uma diminuição ( $P < 0,01$ ) do CUPN e do CRN de 14 e 12 pontos percentuais, observando-se uma diminuição ( $P < 0,05$ ) da retenção (g) diária de azoto de 20% e um aumento ( $P < 0,05$ ) da excreção urinária de azoto em cerca de 40%.

No regime no qual se fez a introdução do feijão frade verificou-se de igual modo uma redução significativa ( $P < 0,01$ ) do CUPN e do CRN, respectivamente de 17 e 12 pontos percentuais. A retenção (g) diária de azoto foi diminuída ( $P < 0,05$ ) em cerca de 30% em relação ao regime base, enquanto a retenção expressa em g/dia/kg de peso vivo foi reduzida ( $P < 0,01$ ) em 26%.

QUADRO IV - EFEITO DAS SEMENTES DE PROTEAGINOSAS NO CRESCIMENTO E BALANÇO AZOTADO DOS LEITÕES.

	Regime	Fava	Tremoço	Feijão	Análise Estatística		(1)
	Base		branco	frade	N	R	DPR
Peso Inicial (kg)	7,245	7,185	7,169	7,378	NS	NS	1,26
Peso Final (kg)	8,408	8,140	8,013	8,142	NS	NS	1,24
Ingestão (g/d)	318	310	296	309	**	NS	22
GMD (g)	180	147	132	117	•	•	36
IC	1,80	2,17	2,78	2,96	NS	NS	0,7
N ingerido:							
(g/d)	9,62	9,95	9,99	9,38	*	NS	1,16
(g/d/kg PV)	1,24	1,31	1,37	1,25	NS	NS	0,18
N retido:							
(g/d)	6,25 <sup>a</sup>	6,31 <sup>a</sup>	5,03 <sup>b</sup>	4,49 <sup>b</sup>	NS	*	0,98
(g/d/kg PV)	0,81 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>	0,70 <sup>ab</sup>	0,60 <sup>b</sup>	NS	**	0,11
N urina:							
(g/d)	1,57 <sup>a</sup>	1,88 <sup>ab</sup>	2,62 <sup>b</sup>	2,10 <sup>ab</sup>	**	*	0,6
(g/d/kg PV)	0,20 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,35 <sup>b</sup>	0,28 <sup>ab</sup>	**	*	0,07
CRN (%) <sup>(2)</sup>	79,9 <sup>a</sup>	77,4 <sup>a</sup>	67,7 <sup>b</sup>	68,2 <sup>b</sup>	**	**	6,37
CUPN (%) <sup>(2)</sup>	65,0 <sup>a</sup>	63,4 <sup>a</sup>	51,1 <sup>b</sup>	48,1 <sup>b</sup>	**	**	6,63

(1) Efeitos: N: ninhada; R: regime; \*\*: P < 0,01; \*: P < 0,05; †: P < 0,10; NS: não significativo, DPR: desvio padrão residual. a, b: Na mesma linha os valores afectados por uma mesma letra não são significativamente diferentes a P < 0,05. (2) CRN: Coeficiente de retenção azotada, CUPN: Coeficiente de utilização prática do azoto.

Finalmente, o regime em que a fava constituiu a principal fonte proteica não afectou significativamente os valores do balanço azotado em relação ao regime base.

## DISCUSSÃO

### Influência do regime sobre a actividade total e específica das enzimas digestivas do pâncreas

De acordo com os nossos resultados a inclusão de sementes de tremço branco doce no regime de desmame dos leitões inibiu a actividade total da lipase e apresentou uma tendência para reduzir a actividade total da tripsina. O aumento do teor em glúcidos parietais do regime com tremço branco doce (Quadro II) pode estimular a secreção de enzimas digestivas no suco pancreático (Corring *et*

*al.*, 1989), reduzindo assim a sua actividade medida nas células do tecido pancreático. Por outro lado, a menor ingestão de alimento observada nos animais que receberam o regime com tremço, apesar de não significativa, poderá também em parte explicar os nossos resultados, face ao papel determinante do substrato alimentar no desenvolvimento das enzimas digestivas (Corring *et al.*, 1989).

A tendência que se verifica para uma redução da actividade total da tripsina pelas sementes de fava miúda é difícil de explicar. Relativamente a esta proteagínosa sabe-se que a presença de taninos condensados pode interferir na actividade das proteases do pâncreas (Jansman *et al.*, 1994). Contudo a fava utilizada no presente ensaio, sendo uma variedade de flor branca deverá ter um baixo teor de taninos, pelo que não é provável que estes compostos fenólicos tenham interferido na actividade da tripsina pancreática. De igual modo, Gabert *et al.* (1996) concluíram que a inclusão de 50% de sementes de fava em substituição de bagaço de soja no regime de desmame de leitões não afectou de forma significativa ( $P>0,05$ ) a actividade total da tripsina pancreática.

A inclusão de feijão frade no regime de desmame dos leitões estimulou a actividade da amilase mas inibiu a actividade da lipase no pâncreas (Quadro III). Embora se conheça o carácter adaptativo destas enzimas à presença dos seus substratos no regime (Corring *et al.*, 1989), as diferenças entre os teores de amido e de lípidos do regime base e do regime com feijão frade foram pequenas (Quadro II), sendo pouco provável que possam justificar os resultados encontrados. Igualmente, a presença de vários FAN nas sementes de feijão frade (Pusztai *et al.*, 1992; Makinde *et al.*, 1996; Erlwanger *et al.*, 1999; Umapathy *et al.*, 1999) torna o fenómeno complexo, e os nossos resultados não permitem esclarecer o efeito destes compostos sobre a actividade das enzimas do pâncreas. De acordo com Erlwanger *et al.* (1999), a inclusão de 75% feijão frade cru em substituição da soja no regime de leitões desmamados aos 28 dias diminuiu a actividade da amilase no tecido pancreático. Por outro lado, Umapathy *et al.* (1999) concluíram que o feijão frade estimula a secreção pancreática do leitão, podendo por este meio interferir na actividade enzimática medida no tecido pancreático.

### **O crescimento e o balanço azotado dos leitões**

A utilização de 30% de feijão frade no regime de desmame apresentou uma tendência para diminuir o GMD e para agravar o IC dos leitões. Estes resultados, embora de acordo com os obtidos por Makinde *et al.* (1996), Erlwanger *et al.* (1999) e Umapathy *et al.* (1999), devem ser encarados com prudência, os

leitões receberam os regimes experimentais apenas durante 11 dias, período claramente insuficiente para uma conclusão clara sobre o efeito destas proteaginosas no crescimento dos leitões.

A análise dos resultados do balanço azotado (Quadro IV) mostra que a composição do regime de desmame não afectou significativamente a ingestão diária de azoto expressa em g/dia ou em g/dia/kg de peso vivo.

Contudo, a substituição de 30% da ração de base por tremoço branco doce degradou significativamente a retenção e a utilização metabólica do azoto pelos leitões (Quadro IV). Resultados semelhantes foram obtidos por Gdala *et al.* (1996) com a inclusão de diferentes níveis (31 a 41 %) de *Lupinus albus* em substituição da cevada no regime de desmame de leitões. Este efeito poderá estar associado não apenas a uma menor digestibilidade total aparente da fracção azotada e dos principais aminoácidos essenciais (lisina, metionina e treonina) do regime (Pereira *et al.*, 1999), mas também a um efeito dos glúcidos parietais do tremoço. De acordo com os resultados da literatura o aumento do teor em paredes vegetais do regime pode alterar o modelo de excreção azotada dos suínos. Assim, a inclusão de glúcidos parietais fermentescíveis na dieta destes animais pode aumentar o crescimento microbiano no intestino grosso com aumento da excreção fecal de azoto de origem endógena (Schulze *et al.*, 1995; Gdala, 1998). Por outro lado, a maior excreção urinária de azoto com o tremoço branco doce (Quadro IV), poderá traduzir uma maior produção de amoníaco no intestino grosso, o qual ao ser absorvido é eliminado na urina sob a forma de ureia.

Os animais que receberam o regime no qual se fez a introdução do feijão frade apresentaram um agravamento significativo do conjunto dos parâmetros do balanço azotado (Quadro IV). Makinde *et al.* (1996) verificaram que a inclusão de feijão frade no regime de desmame de leitões em substituição de bagaço de soja originou um aumento do teor de proteína nas fezes dos animais, referindo que os FAN presentes nesta proteaginososa terão estado na origem das alterações na morfologia da mucosa do intestino e dos parâmetros fecais observados.

O efeito negativo do feijão frade na utilização digestiva ileal e total da proteína e dos aminoácidos do regime poderá justificar estes resultados (Pereira *et al.*, 1999). Na realidade, os baixos valores de digestibilidade ileal da lisina, metionina, cistina e treonina do feijão frade (Pereira *et al.*, 1999) limitam certamente o valor biológico desta proteína, com reflexo negativo no crescimento e no balanço azotado dos leitões. A presença de factores antitripsínicos nas sementes do feijão frade ao interferir na digestibilidade do azoto poderá estar na origem destes resultados. Segundo Bengala Freire *et al.* (1991) a presença de factores

antitripsínicos da ervilha no regime dos leitões degradou o conjunto dos parâmetros do balanço azotado destes animais. Da mesma forma em ensaios realizados com ratos, Pusztai *et al.* (1992) verificaram que a introdução do factor antitripsina do feijão frade, na quantidade que normalmente ocorre no grão desta proteagínosa, num regime à base de amido e de albumina láctica levou a uma diminuição significativa dos parâmetros do balanço azotado.

Por último, o regime em que a fava constituiu a principal fonte proteica não afectou o CRN e o CUPN dos leitões. Estes resultados não são inesperados, uma vez que a fava utilizada neste ensaio corresponde a uma variedade de flores brancas com baixo teor em taninos e estão de acordo com os resultados obtidos por Jansman *et al.* (1993).

### CONCLUSÃO

No plano zootécnico a inclusão de 30% de feijão frade ou de 30% de tremçoço branco doce no regime de 1ª idade degradou as performances zootécnicas dos leitões, enquanto que a utilização de 30% de uma variedade de fava miúda com flor branca revelou-se sem efeito. A resposta adaptativa das enzimas digestivas do pâncreas às diferentes fontes proteicas não foi clara, podendo ter sido condicionada pela presença de factores antinutricionais nas sementes das proteagínosas estudadas. Relativamente ao balanço azotado, o feijão frade e o tremçoço branco doce influenciaram negativamente a retenção azotada dos leitões. Pelo contrário, a utilização de 30% de fava miúda não afectou os parâmetros do balanço azotado dos leitões comparativamente ao regime controlo. Em conclusão, a fava miúda com baixo teor de taninos revelou-se, entre as proteagínosas estudadas, como a mais promissora na perspectiva de poder ser incluída no regime de desmame do leitão, constituindo uma boa fonte proteica complementar à proteína dos cereais.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENGALA FREIRE, J. P., AUMAITRE, A. e PEINIAU, J., 1991. Effects of feeding raw and extruded peas on ileal digestibility, pancreatic enzymes and plasma glucose and insuline in early weaned pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 65: 154-164.
- CORRING, T., JUSTE, C. e LHOSTE, E.F., 1989. Nutritional regulation of pancreatic and biliary secretions. *Nutr. Res. Rev.*, 2, 161-180.

- ERLWANGER, K.H., UNMACK, M.A., GRONDAHL, M.L., PIERZYŃOWSKY, S.G., AALBAEK, B., DANTZER, V. e SKADHAUGE, E., 1999. Effects of dietary substitution with raw and heat-treated cowpea (*Vigna unguiculata*) on intestinal transport and pancreatic enzymes in the pig. *J. Vet. Med.*, 46: 581-592.
- GABERT, V.M., SAUER, W.C., L.I. S., FAN, M.Z. e RADEMACHER, M., 1996. Exocrine pancreatic secretions in young pigs fed diets containing faba beans (*Vicia faba*) and peas (*Pisum sativum*): Nitrogen, protein and enzyme secretions. *J. Sci. Food Agric.*, 70: 247-255.
- GDALA, J., JANSMAN, A.J.M., VAN LEEUWEN, P., HUISMAN, J. e VERSTEGEN, M.W.A., 1996. Lupins (L-luteus, L-albus, L-angustifolius) as a protein source for young pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 62: 239-249.
- GDALA, J., 1998. Composition, properties, and nutritive value of dietary fibre of legume seeds. A review. *J. Anim. Feed. Sci.*, 7: 131-150.
- GRALA, W., JANSMAN, A.J.M., VAN LEEUWEN, P., HUISMAN, J., VAN KEMPEN, G.J.M. e VERSTEGEN, M.W.A., 1993. Nutritional value of faba beans (*Vicia faba* L.) fed to young pigs. *J. Anim. Feed. Sci.*, 2: 169-179.
- INRA, 1984. L'alimentation des Animaux Monogastriques: Porc, Lapin, Volailles, 2<sup>a</sup> edición, INRA, Paris, 282 p.
- JANSMAN, A.J.M., VERSTEGEN, M.W.A. e HUISMAN, J., 1993. Effects of dietary inclusion of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low and high content of condensed tannins on digestion and some physiological parameters in piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 43: 239-257.
- JANSMAN, A.J.M., ENTING, H., VERSTEGEN, M.W.A. e HUISMAN J., 1994. Effect of condensed tannins in hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) on the activities of trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1) in digesta collected from the small intestine of pigs. *Br. J. Nutr.*, 71: 627-641.
- JANSMAN, A.J.M., VERSTEGEN, M.W.A., HUISMAN, J. e VAN DEN BERG, J.W.O., 1995. Effects of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low or high content of condensed tannins on the apparent ileal and fecal digestibility of nutrients and the excretion of endogenous protein in ileal digesta and faeces of pigs. *J. Anim. Sci.*, 73: 118-127.
- LEIBHOLZ, J., 1981. Digestion in the pig between 7 and 35 d of age. The digestion of hydrolyzed milk and soya-bean proteins. *Br. J. Nutr.*, 46: 59-69.
- LIENER, I.E., 1990. Naturally occurring toxic factors in animal feedstuffs. In: J. Wiseman and D.J.A. Cole (Eds), *Feedstuff Evaluation*. Butterworths, London, pp.377-394.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. e RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MAKINDE, M.O., UMAPATHY, E., AKINGBEMI, B.T. e MANDISODZA, K.T., 1996. Effects of feeding different levels of cowpea (*Vigna unguiculata*) on gut morphology and faecal composition in weanling pigs. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 26: 42-46.
- MCNIVEN, M.A. e CASTEL, A.G., 1995. Replacement of soybean-meal with lupinseed (*Lupinus-albus*) in pig starter diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 52: 333-338.
- NEWPORT, M.J., 1979. Artificial rearing of pigs. Effect of replacement of dried skim-milk by fish-protein concentrate on performance and digestion of protein. *Br. J. Nutr.*, 41: 103-110.

- PEINIAU, J., AUMAITRE, A. e LEBRETON Y., 1996. Effects of dietary protein sources differing in solubility on total tract and ileal apparent digestibility of nitrogen and pancreatic enzymes activity in early weaned pigs. *Livest. Prod. Sci.*, 45: 197-208.
- PEREIRA, J.A., FREIRE, J.P.B., CABRAL, F.M., MOURATO, M. e CUNHA, L.F., 1999. Digestibilidade total e ileal do tremço (*Lupinus albus*) da fava miúda (*Vicia faba*) e do feijão frade (*Vigna unguiculata*) pelo leitão desmamado precocemente. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, VI(2): 87-97.
- PUSZTAI, A., GRANT, G., BROWN, D.J., STEWART, J.C., BARDOZ, S., EWEN, S.W.B., GATEHOUSE A.M.R. e HILDER, V., 1992. Nutritional evaluation of the trypsin (EC 3.4.21.4) inhibitor from cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.). *Br. J. Nutr.*, 68: 783-791.
- SAS, 1989. SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 2, SAS Institut Inc, Cary, NC, 846 p.
- SAUVANT, D., PEREZ J.M. e TRAN, G., 2002. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage. INRA, 147, rue de l'Université, Paris, France, 301 p.
- SCHULZE, H.P., VAN LEEUWEN, M., VERSTEGEN, J. e VAN DEN BERG, 1995. Dietary level and source of neutral detergent fiber and ileal endogenous nitrogen flow in pigs. *J. Anim. Sci.*, 73: 441-448.
- THIVEND, P., MERCIER, C. e GUILBOT, A., 1965. Dosage de l' amidon dans les milieux complexes. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 5: 513-526.
- UMAPATHY, E., ERLWANGER, K.H., MAKKAR, H.P.S., BECKER, K. e PIERZYNOWSKI, S.G., 1999. Effects of cowpea (*Vigna unguiculata*) feeding on the pancreatic exocrine secretion of pigs. *J. Anim. Physiol.*, 82: 57-65.
- VAN BARNEVELD, R.J., 1999. Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutr. Res. Rev.*, 12: 203-230.
- VAN DER POEL, A.F.B., DELLAERT, L.M.W., VAN NOREL, A. e HELSPER, J.P.F.G., 1992. The digestibility in piglets of faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by breeding towards the absence of condensed tannins. *Br. J. Nutr.*, 68: 793-800.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B. e LEWIS, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74: 3583-3597.

---

## IMPROVING COW COMFORT THROUGH APPROPRIATE STALL, FLOORING AND COOLING SYSTEMS DESIGN

J. R. BICUDO

Department of Biosystems and Agricultural Engineering, University of Kentucky, 128 C.E.  
Barnhart Bldg., Lexington, KY 40546-0276; E-mail: [jbicudo@bae.uky.edu](mailto:jbicudo@bae.uky.edu)

*(Invited communication)*

### ABSTRACT

It was not until recently that researchers began to apply modern techniques, such as video and other reasonably inexpensive continuous monitoring equipment, to the study of cow comfort. Also preference testing has been used to identify the most important features of free stall design and how a specific treatment affects animal behavior. It is well known that cow comfort and barn or lot cleanliness are basic requirements for improving cow health and productivity. On the other hand different bedding materials may affect cow behavior and comfort as well as udder health and manure management. For example, a recent survey among 300 Wisconsin dairy producers indicated that producers using sand seemed to be more satisfied with cow comfort and less happy with manure management and bedding issues than those using mattresses (Palmer and Bewley, 2001). Providing reasonably comfortable conditions to dairy cows during hot weather can also be challenging when associated with issues related to bedding, flooring, and manure management. High humidity levels, low air velocities, and solar radiation contribute to heat stress. Dairy cows that suffer from heat stress have reduced feed intake, milk production, and reproductive efficiency. Misting, sprinkling, and fan cooling can be effective in relieving heat stress in dairy cows under hot and humid conditions. As with free stall and flooring design, cooling options that seem favorable in terms of cow or producer preferences need to be tested under production conditions to determine their effects on milk production, cow reproduction, general herd health and other management issues. This paper summarizes existing information on the enhancement of cow comfort through appropriate stall, flooring and cooling systems design.

Key-words: Cow, comfort, behavior, flooring and cooling systems

### STALL DESIGN

Much controversy still exists between tie-stalls and free-stalls (Valde *et al.*, 1997; Bergsten and Helin, 1996), and also between full or partial confinement (giving cows access to pasture or loafing lots) (Livesey *et al.*, 1998; Vermunt and



Greenough, 1996) as far as hoof lesions and lameness are concerned. According the U.K. Farm Animal Welfare Council the problem of lameness is one of the main threats to dairy cattle welfare, and that the present incidence of lameness on dairy farms is unacceptable. This seems to be equally true for Canada and the U.S. Pajor *et al.* (2000) discussed if the present move towards free stalls in dairy production, particularly when cows do not have access to pasture, would result in an increase in the incidence of lameness, which is also a substantial economic problem. Therefore, improving cow comfort through stall design can be a key factor in reducing stress and optimizing production.

There is currently no single stall size or design that will suit every freestall dairy barn or shelter. However, existing guidelines usually allow for the design of comfortable resting areas for dairy cows. The freestall is a system made up of individual parts that act together to provide good environment, cleanliness and comfort to the cow. Therefore it is important to understand cow behavior related to freestall as well as interactions among individual freestall components to design (Bickert, 2000).

Selecting the correct dimensions and stall features is essential to creating a comfortable resting area. Small differences of only a few centimeters can cause problems related to comfort, cleanliness, and manure management. Ideally, freestall dimension are determined by the size of cows to use them. According to MacFarland (2003), freestalls must not interfere with the normal reclining, resting, and rising behavior of cows and dimensions should accommodate the largest cows in the group. Fig. 1 shows suggested freestall dimensions for a 650 kg cow (adapted from McFarland, 2003)

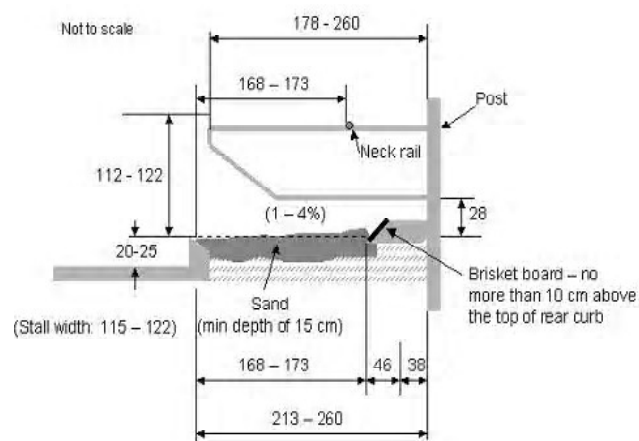


Figure 1. Suggested freestall dimensions for 650 kg cows (all values are in cm).

Freestalls based on the lower range values tend to result in cleaner bedding than stalls built on the basis of the larger range. Cows tend to lie straighter in less spacious stalls and are less likely to lie too far forward. Far-off and close-up dry cows would benefit from stalls built based on the upper dimension range values as the extra space can be used more effectively by these heavier animals (Gooch and Stone, 2003).

One of the most important features of freestall design is the provision of a lunge space for cows to rise. Accounting for the lunge space is key to providing stalls that cows will use readily (Bickert, 2000). The lunge space may be provided either forward or to the side. This space ranges from 25 to 56 cm and should be added to the body and head space length if it is provided forward (total stall length at least 244 cm). If space for lunge is provided to the side into an adjacent stall space, overall stall length need only be 214 cm.

Side and forward lunge freestalls differ in partition shape and in stall base design at the front of the stall (Bickert, 2000). Both types provide space beneath the lower rail to minimize contact with the hip and pelvic area of the cow, reducing the potential for injury.

Brisket boards define the available body space on the stall bed and discourage the cow from moving too far forward into the stall when she is in a lying position. A brisket board is an essential component where lunge space is provided forward, and also help position the cows to prevent them defecating in the stall.

The neck rail across the top rail of the stall partition encourages cows to back up when standing up and stops them from moving too far forward when entering or standing in the stall.

Freestalls are designed to favor stall acceptance and increased cow comfort, so it is important that all components of a stall system act together, related to one another. For example, longer, wider stalls maybe more comfortable, but they can result in a higher proportion of cows lying too far forward or diagonally. Positioning and dimensions of the brisket board are directly related to the position and height of the neck rail. If the brisket board is not positioned appropriately, cows may get trapped in the head and lunge area, especially if the neck rail is too low. Higher neck rails are less likely to get in the way of a rising cow, but are more likely to allow it to stand farther forward, which may result in defecation in the stall. Neck rail placement involves a trade-off between allowing cow access to a more comfortable standing surface and increased stall maintenance. Tucker and Weary (2003) have recently reported on a study where animals were housed either with or without a neck rail, and examined the differences in stall cleanliness. They

found that when the neck rail was absent, animals were 58% more likely to defecate while standing in the stall. There was no effect of the presence or absence of the neck rail on the number of times animals defected in the stall while lying down. Other studies related to the position of the neck rail showed that neck rail placement did not affect how much time cows spent lying down, but it did affect the type of standing (half-in-half-out or four legs in the stall) in the stall.

One of the best ways to evaluate freestall comfort is to conduct close observations of the cow's daily pattern of rest/activity including lying, standing, and eating times. An increase in the amount of time cows spend standing inactive may be indicative of freestall problems (Pajor *et al.*, 2000). Other behavioral measures likely to change when a cow is uncomfortable include the time spent lying and standing, and the number of times she is willing to stand up (Haley *et al.*, 2000).

### **BEDDING PREFERENCES**

Bedding for dairy cattle has been the topic of several research experiments comparing different surfaces and materials in different ways (for example, using different stocking rates, different sizes of freestalls, etc.). According to a review conducted by Tucker and Weary (2001), the general conclusion is that dairy cows prefer softer surfaces.

The preferred methods for freestall base and bedding include the use of mattresses with dry bedding on top (usually saw dust) or a deep layer of sand. Sand bedding is usually viewed as the best bedding type for cow comfort. Farmers who switched to sand bedding usually quote gains in milk yield and improved health benefits such as increased heat detection and pregnancy rates and decreased injuries and lameness. Weary and Taszkun (2000) scored hock lesions on 20 dairy farms using sawdust, sand, or geotextile mattresses for bedding. Lesions were most prevalent and severe on farms using geotextile mattresses (91% of cows) and least common and less severe on farms that used sand (24% of cows). It was also found that on farms using sawdust as bedding, there was a significant negative relationship between the length of the stall and severity of lesions. Cook (2001) reported on a survey in 30 Wisconsin dairy herds. Farms were visited once in the summer and once in the winter, and sand bedded stalls were compared with herds using a variety of other stall bases and bedding, such as concrete, mats or mattresses with a layer of organic bedding in either free or tie

stall barns. Farms utilizing sand bedding had about one-half as much lameness, much fewer hock abrasions, and a higher cow comfort index than farms using other stall bases.

Sand is a poor medium for bacterial growth, and therefore may help reduce the incidence of environmental mastitis. However, a survey conducted among 300 Wisconsin dairy farmers (Palmer and Bewley, 2001) showed that the average linear somatic cell scores (SCS) of herds using sand or mattress based freestalls were not significantly different (Table I). This survey also indicated that farmers using mattresses were more satisfied with bedding usage/cost and manure management than those using sand. On the other hand, farmers using sand seemed more satisfied with cow comfort, cow cleanliness, hock damage, and udder health.

TABLE I - COMPARISON OF SAND AND MATTRESSES (Palmer and Bewley, 2001).

	Mattresses	Sand
Number of herds	69	145
1998 median herd size	265	195
1998 RHA milk (kg)	10215	10224
Linear SCS	2.88	2.80
Culling rate (%)	34	32
Cost per stall (US\$)	1306	946
	Average satisfaction reported*	
Cow comfort	4.42	4.55
Cow cleanliness	4.12	4.47
Hock damage	4.22	4.72
Teat damage	4.48	4.59
Udder health	4.09	4.31
Bedding usage and cost	4.25	3.95
Manure management	4.32	3.43

\* Scale from 1 (very dissatisfied) to 5 (very satisfied).

A recent study by Palmer and Wagner-Storch (2003) compared six different stall base types including soft rubber mats, foam and vinyl-filled mattresses, rubber-filled mattresses, waterbed, sand and concrete in a 104-cow freestall barn with different stocking rates. One side of the barn had 100% stocking rate while the other side has 70% stocking rate. The lower stocking rate side did not have sand bedding as an option. Cows were most likely to lie down in sand-bedded stalls but overall occupancy rates, which included the percentage of cows stand-

ing or lying, were higher in stalls with rubber-filled mattresses. Results are summarized in Figs. 2 and 3.

The study conducted by Palmer and Wagner-Storch (2003) also indicated the following: (i) that not all mattresses are equally desirable to cows; rubber-filled mattresses ranked consistently higher than foam and vinyl filled mattresses for lying and occupancy percentages; (ii) waterbeds required a longer adaptation time whereas use of soft rubber mats decreased over time; (iii) cows preferred mattresses during periods of hot and cold temperatures; (iv) as stocking density increased, stall usage percentage increased.

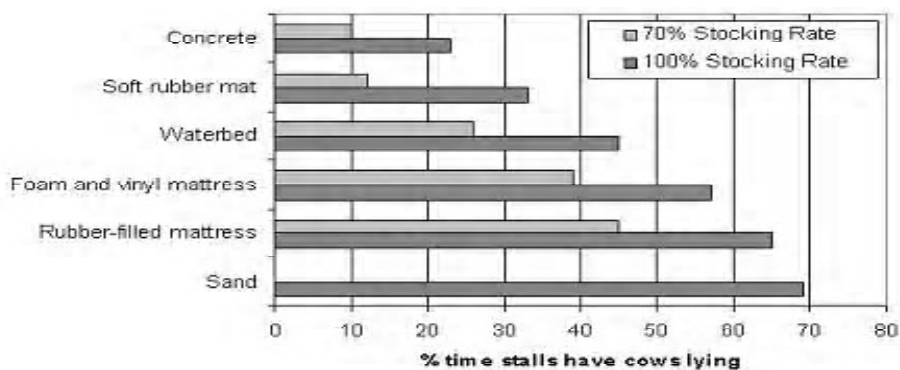


Figure 2. Percent of times stalls have cows lying in them by stall base type (adapted from Palmer and Wagner-Storch, 2003).



Figure 3. Percent of times stalls are occupied (cows lying or standing) by stall base type (adapted from Palmer and Wagner-Storch, 2003).

Cook (2001) summarized the following as the main problems encountered by farmers when using sand for stall bedding: use of poor quality sand, insufficient sand, loss of sand, and cost of removal. Some of the recommendations given to minimize the first three of these problems included (Stowell and Inglis, 2000 Cook, 2001): (i) sand washing, screening and grading before purchase; fresh bedding sand should be virtually clean of organic matter, preferably less than 2% on a dry basis; most sand grains should be between 0.1 and 2.0 mm in size and particles should be uniformly sized; if sand is wet when it arrives, it should be stored and allowed to dry before use; (ii) stalls must be kept filled weekly and raked daily to ensure the bed is level, sloping slightly upwards towards the brisket board, and that a depth of 15 cm of sand is maintained; average sand use should be around 4 m<sup>3</sup> per stall per year, or 18 kg per stall per day; (iii) appropriate stall design and management should minimize loss of sand; sand can be lost when cows have too much weight resting of their rear feet when standing in the stall due to some kind of lunge impediment.

Removal of sand bedding from barns can be challenging and costly. Sand and manure mixed together forms an abrasive and gel-like substance that is not readily pumpable or flowable by gravity. Detailed planning of the manure system, including selection of handling equipment, storage type and land application methods is essential (Wedel, 2000). However, improvements in cow health and performance can more than offset problems with manure handling systems when dairies convert to sand bedding. Also, savings from lower lameness levels in the herd can easily cover the cost of sand purchase (Cook, 2001).

Comfortable bedding contributes to cow longevity, less lameness problems and stress, better udder health if the surface is kept clean, more efficient feed conversion, and better milk production. As shown by the Palmer and Wagner-Storch (2003) study, softer mattresses can work as well as sand, which in turn is no better than anything else if it is not managed well and maintained (Jacobs, 2003).

## **FLOORING ISSUES**

Mobility is probably the most important factor for the efficient operation of a freestall barn. Dairy cows walk from the barn to the milking parlor and back, and between stalls and feeding and drinking areas. Albright (1995) recommends that cows need to walk between 3 to 4 km per day to keep them healthy and exer-

cised. Standing time on concrete is heavily influenced by the environmental design of dairy facilities and modified by overcrowding and management activities (Guard, 2000).

Wet concrete and uneven walking surfaces may contribute to lameness. Guard (2000) has reviewed the relationship between floor surfaces and lameness and provided recommendations on design strategies and flooring systems to improve cow comfort. For example, Guard (2000) suggested that barn floors be surfaced with something rather than concrete and that routine hoof trimming could help prevent many of the more severe cases of lameness. A more recent study by Jungbluth *et al.* (2003) indicated that soft floors improved claw health and slip resistance. Step length, walking speed and animal activity were higher on compact rubber mats than on concrete floors. Data obtained by Volkey *et al.* (2003) indicated that animals on rubber flooring and sand stalls had the least tendency for developing overgrown claws or an imbalance between lateral and medial claws. Although more research on the effect of these changes on lameness is needed, it is of interest to note that the installation of rubber by feed alleys, in holding areas, along parlor return lanes, and most recently complete alley covering with rubber mats has been increasing (Guard, 2000).

According to Gooch (2003), the finish on a concrete floor is often the biggest mistake made during barn construction. Rough concrete can result in significant foot wear and high cull rates during new barn occupancy (Bray, 1998). Gooch (2003) defines a cow-friendly floor as a floor that provides: (i) a relatively dry walking surface; (ii) confident and comfortable footing; and (iii) durability. In addition, at least a portion, if not all, of the flooring surface should have resilient characteristics in order to offer a cow reprieve from hard concrete by moving them to managed grassed areas or to earthen lots, when appropriate, during dry periods. This practice has been shown to be beneficial to overall foot and leg health (Faull *et al.*, 1996), but not always available in large dairy farms.

There are several techniques used to provide traction on concrete floor. One of the most practical techniques recommends installing 1 to 1.3 cm wide by 1 to 1.3 cm deep grooves parallel to the direction of scraper travel. Grooves should be spaced 5 to 7.5 cm on center. A diamond floor pattern can be developed by installing two sets of parallel grooves in different directions spaced 10 to 15 cm apart (Graves *et al.*, 1997). Additionally, the following criteria should be met when grooving concrete floors (Schoonmaker, 2002): (i) the floor space between each groove is flat, or level; (ii) a smooth surface between each groove; and (iii) groove edges

that form a right angle with the floor surface. Gooch (2003) describes several grooving techniques in detail.

The use of conventional or fully slatted floors for dairy cows have been de-emphasized over the years due to foot problems and decreased cow comfort (Albright, 1995). A recent study by Telezhenko *et al.* (2002) on the anatomy of a cow trackway showed that cows could alter gait and locomotion when walking on a slippery, slatted floor. Cows placed their rear feet outside the track of the front feet. In doing so, researchers believe the weight increases on the sole of the outer claw and predisposes it to sole lesions. Different design configurations, such as waffle slats (Figure 4), are popular in several states and cows seem to walk comfortably on this type of floor (Gooch, 2003). The design consists of a series of openings approximately 4.5 by 20 cm spaced about 7.5 cm lengthwise and 13 to 15 cm apart.



Figure 4. Waffle and conventional slatted floors.

Concrete flooring and differences in floor configurations and height are associated with laminitic injuries in livestock. However, as pointed out by Bell and Weary (2000) there has been very little experimental work on effects of flooring, and no work on factors such as the texture of the surface and grooving techniques, wetness, and slurry depth and their possible relationship to laminitis. Observation has shown that when given a choice cows prefer to walk on solid flooring or floors covered with a rubber surface than on slatted flooring. Therefore, it is likely that any negative effects of flooring will be mitigated by design and management practices that reduce the need for cows to spend long periods walking or standing.



## COOLING STRATEGIES

Proper ventilation and supplemental cooling are key components to successful cow comfort and well being during summertime. Freestall barns that are properly designed should provide maximum natural ventilation, but additional cooling equipment may be needed to minimize heat stress conditions, which in turn leads to declined milk yields (West *et al.*, 1991; Holter *et al.*, 1996). Dairy cows can be heat-stressed when a combination of the following conditions exists (Bickert *et al.*, 2000): high daytime temperatures, high nighttime temperatures, high relative humidity, and low wind velocities.

Building size and design can influence ventilation rates, and indirectly cow comfort (Brouk *et al.*, 2001). For example, while two-row barns may be adequately ventilated with a 1.6 km/h wind, six-row barns require almost 5 km/h wind for adequate ventilation. Also increased stocking rate (as it usually happens with six-row barns) increased the heat load. Armstrong *et al.* (1999) reported on the effects of roof design (slope, eave height, ridges) on cow respiration rates. Their results suggest that natural ventilation was greater in roofs with steeper slope. Armstrong

(1999) also observed higher respiration rates in the afternoon for cows housed in barns with covered ridges.

Fans help increase air movement over cows' bodies and thus help minimizing heat stress conditions. The animal is cooled when the cooled air is blown over its body and also when cooled air is inhaled. Air should move past cows' bodies at 1 to 2 m/s. Usually high-speed fans (propeller or axial-flow fans) with a fairly tight cone that can throw air at a distance equivalent to 10 times the fan diameter are used for these applications (Stowell, 2000). These fans can generate about 17,000 m<sup>3</sup>/hr per 0.4 kW (0.5 HP) at little or no static pressure. Supplemental cooling fans should be installed in all areas where cows may be confined for extended periods and over areas where cows are intended to voluntarily spend considerable amounts of time, such as holding areas and alongside feeding areas (Fig. 5). Preference should be given to cows with special needs when installing fans.

Fans over freestalls are usually mounted a minimum of 2.4 m above freestalls or feeding area (Fig. 6). If using a single row of fans, preference should be given to the feeding area. Compromise arrangements using a single row of fans to move air over both the feeding areas and freestalls should be avoided. Based on the recommendations above, the number of cooling fans to be installed in a 4-row barn that is 36 m long could be as high as 24 assuming 90-cm fans were used.



Figure 5. High-speed fans installed over the feeding area.

In holding pens, supplemental cooling fans should be located to direct air away from the parlor or across the pen in the direction of prevailing summer wind. The fan system should be capable of moving 1700 m<sup>3</sup>/hour per cow in the holding pen (Harner *et al.*, 2000). A holding pen with a 100-cow capacity with typical size of 10 x 15 m would require ten 75 to 90-cm fans with total fan capacity of 170,000 m<sup>3</sup>/hour.

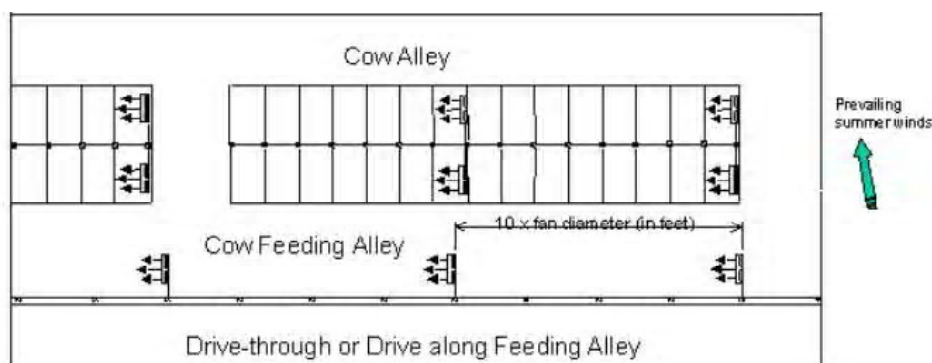


Figure 6. Placement of supplemental cooling fans in a freestall barn (Gooch, 2000).

Spain and Spiers (1998) investigated the effect of fan cooling on thermoregulatory responses of dairy cows. Fan cooling resulted in rapid reduction of core body temperature of about 0.5 °C within four hours, followed by a slower decrease of approximately 0.3 °C over the next 20 h. However, milk production, feed and water intake remained at lower levels. The lack of response was attributed to the short duration of the fan cooling recovery period. Time of cooling can influence

cooling system benefits (Spiers *et al.*, 1998). Spiers *et al.* (1998) reported, “fan cooling during the night period is superior to day cooling in reducing heat load of dairy cows”. Exposure to heat stress for up to 6 days showed magnified separation of day-cooled versus night-cooled cow body core temperature, and performance increases demonstrated the derived benefit of nighttime fan cooling. On a more recent study, Spiers *et al.* (2001) showed that nighttime fan ventilation for 12 h at low and high air temperatures resulted in the same cooling benefits as 24 h of fan ventilation under the same thermal conditions. Difference in performance occurred when air temperature descended to only 26 °C. At this point, 24 h of fan ventilation was superior to only 12 h of nighttime ventilation.

An alternative to high-speed fans that has good potential for freestall barns is the use of high volume low speed (HVLS) fans (Fig. 7).



Figure 7. HVLS fan installed on a freestall barn.

HVLS fans are equipped with ten 3.0 to 3.65 m aluminum airfoils (paddles) turned by a 0.56 kW (0.75-HP) motor. The 7.3 m diameter fan operates at a speed of 50 rpm. Air volume moved by a 7.3 m HVLS fan ranges from 200,000 to 250,000 m<sup>3</sup>/hour (Kammel *et al.*, 2003).

On dairy barn applications HVLS fans are spaced 18 m apart. Product literature states that the air current from a large volume fan approaches floor level in a radial jet of a size equivalent to the fan's diameter, and then turns into a horizontal jet that radiates out in all directions. When several fans are mounted in a large open space such as a dairy barn, it is suggested that adjacent floor jets act much

like vertical partitions, directing the jet upwards, recirculating the air back to the fan, and creating convection-like currents that gain momentum over time (Fig. 8).

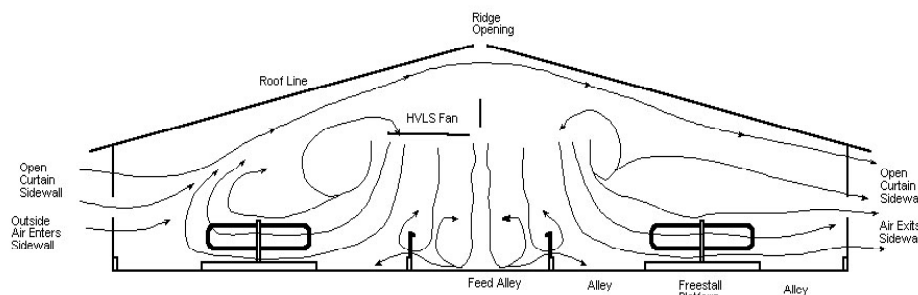


Figure 8. Airflow patterns created by HVLS fans (Kammel *et al.*, 2003).

Measurements by Kammel *et al.* (2003) indicate that the horizontal velocity was highest (approximately 2.5 m/s) at 0.30 m off the floor and at a 6 m radius from the center of the fan.

HVLS fans have been installed in several barns in Wisconsin and California. Recent air velocity measurements made in several barns in Wisconsin (Kammel *et al.*, 2003) indicated air movement above 0.5 m/s over most of the barn areas. Velocity data collected in that study suggested that velocities of 1.0 to 1.5 m/s could be achieved over the feed bunk in a 4 or 6-row barn layout. Velocities between 0.5 and 1 m/s were documented over the interior row of freestall platforms for 4 or 6-row barns. Lower than 0.5 m/s were measured at the outside row of freestall platforms in a 6-row barn.

Field experiments conducted in California showed that HVLS fans produce similar positive animal response in dairy operations to that of the traditionally used 0.9-m high-speed fan under relatively dry weather conditions (Shultz, 2002). Fans enhance convective heat loss, and were found to improve cow comfort and performance both in the holding area of the milking parlor and free stall barn.

Additional research to assess velocity profiles for other fan arrangements and conditions as well as to assess the efficacy of HVLS fans in terms of their capacity for providing supplemental cooling to dairy cows under hot and humid conditions is needed.

The concept of sprinkling dairy cows with water to accomplish evaporative cooling has been studied and applied for more than 10 years in dairy barns (Strickland *et al.*, 1989, Turner *et al.*, 1992). Low-pressure sprinklers and fans are used in combination to cause evaporative cooling at the skin and hair coat level. Heat

from the cow's body causes the moisture to evaporate. Air movement is needed in humid climates to provide enough drier air above the skin to help evaporate the water. These systems operate at a pressure of about 70 to a 140 kPa (10 to 20 PSI).

High-pressure systems, also called foggers, operate at much higher pressures, over 4,500 kPa (700 to 800 PSI). They create very fine droplets that evaporate in the air, reducing the air temperature a few degrees. The amount of cooling achieved depends on the temperature, relative humidity, and the amount of water mist evaporated. As humidity increases in the environment, the ability to evaporate water decreases. For this reason high-pressure systems work best in dry climates while low-pressure systems can be used in any climate to cool cows.

Both low and high-pressure sprinkling systems can be used along feed areas, in holding pens, and at the exit of the milking parlor. Existing studies on freestall barn cooling trials have been more successful in cooling cattle in the feeding area. Most studies show higher feed intake and higher milk production by cooled cows, as well as lower body temperatures and respiration rates (Turner *et al.*, 1992). In a more recent study, Calegari *et al.* (2003) reported that cows kept under a fogger system installed near the feeding area produced nearly 3 kg of milk per cow per day more than cows kept in a control pen without supplemental cooling.

Lin *et al.* (1997) tested several combinations of low and high-pressure sprinkling systems and their effect on milk production in Alabama. Cooling systems tested included: (i) sprinklers over the feed lane and foggers over the freestalls; (ii) sprinklers only over the feed lane; (iii) foggers only over the freestalls. Daily milk production was the highest with the combination sprinklers over the feed lane and foggers over the freestalls (23.6 kg) and lowest with no water-cooling (21.2 kg). Milk production was the same (22 kg) with the other two treatments.

Brouk *et al.* (2003) has recently investigated the effect of sprinkling frequency and airflow on respiration rate, body surface temperature and body temperature. Treatments were four different wetting frequencies (no wetting, 1 minute every 5 minutes, 1 minute every 10 minutes, and 1 minute every 15 minutes) with or without supplemental airflow (none or 19.8 m<sup>3</sup>/min). Wetting had a greater effect on respiration rate than airflow, but the combination of wetting and airflow had the greatest effect in lowering both respiration rates and body temperatures. The most effective treatment included continuous supplemental airflow and wetting every 5 minutes (Fig. 9).

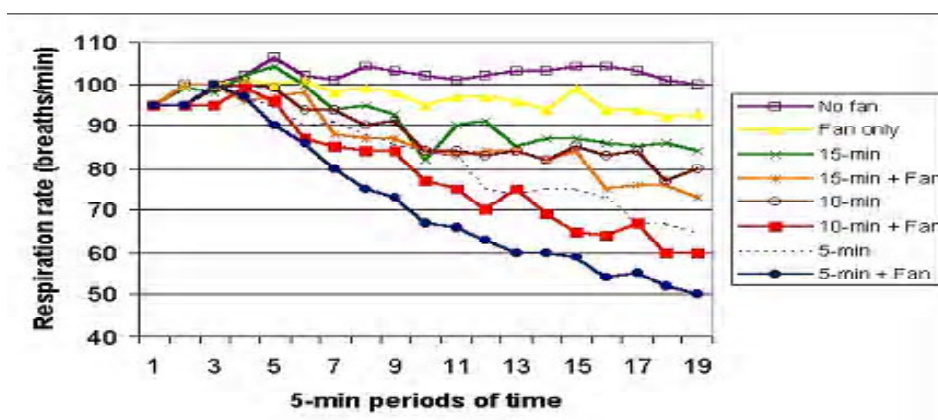


Figure 9. Respiration rate of thermal-stressed dairy cows under different cooling treatments (Brouk *et al.*, 2003).

Brouk *et al.* (2003) suggested that different cooling strategies could be developed for different levels of heat stress. Under severe heat stress (or at air temperatures above 32 °C) soaking for 1 minute every 5 minutes with fan cooling would be the most effective. Under periods of moderate stress (air temperatures between 27 and 32 °C) soaking every 10 minutes with fan cooling would be adequate. Soaking frequency could be reduced to 15 minutes when air temperatures were between 21 and 27 °C.

Most cooling systems are controlled using timers, or one or more thermostats. Conventional controllers use the current value of temperature and a user-defined target value to determine which stage of ventilating and/or cooling equipment to activate. As the difference between the barn air temperature and the target temperature increases, additional ventilating and/or increased sprinkling frequency is activated.

Timmons *et al.* (1995) have developed a method of cooling system control called time-integrated-variable (TIV) control. The TIV control method reduces the cooling set point in response to a period of heat stress as determined by temperature history. This approach allows implementation of a modified night cooling strategy during periods of previous heat stress history, thus enabling animals to better compensate for heat stress conditions. Unlike a thermostat, the TIV assesses the barn's inside temperature for a 12-hour rolling temperature average. It also calculates and maintains a running record of the average temperature inside the barn for the previous 24 h. The TIV can therefore indicate the cumulative heat stress

that animals have been subjected to. The use of TIV controller in dairy barns is being currently evaluated in several New York dairies by Cornell University researchers (Gooch and Timmons, 2002).

Research on the interaction between different types of bedding, flooring, and cooling systems is needed in order to evaluate the impact of a "total" system on cow comfort and behavior.

## CONCLUSIONS

Cow comfort is recognized as one of the most important factors contributing to performance and health of dairy cows. Several strategies and techniques are currently available to increase cow comfort in dairy operation, and as a consequence significant improvements in cow well-being, performance and milk production are possible. Although there are still a large number of research questions to be answered, the bottom line is that the design and operation of existing and new facilities should take into account not only the environmental needs of animals, but also the way animals interact with the facility.

## REFERENCES

- ALBRIGHT, J.L., 1995. Flooring in dairy cattle facilities. *NRAES Animal Behavior and the Design of Livestock and Poultry Systems International Conference, NRAES-84, Cornell University, Ithaca, NY.*
- ARMSTRONG, D.V., HILLMAN, P.E., MEYER, M.J., SMITH, J.F., STOKES, S.R. and HARNER III, J.P., 1999. Heat stress management in freestall barns in the western US. *Procs. of the 3<sup>rd</sup> Western Dairy Management Conference, April 8-10, Las Vegas, pp. 88-98.*
- BELL, E. and WEARY, D.M., 2000. The effects of farm environment and management on laminitis. *Procs. of the 35<sup>th</sup> Annual Pacific Northwest Animal Nutrition Conference, Spokane, WA, pp. 179-189.*
- BERGSTEN, C., 1994. Haemorrhages of the sole horn of dairy cows as a retrospective indicator of laminitis: an epidemiological study. *Acta Agriculture Scandinavia, 35(1): 55-66.*
- BERGSTEN, C. and HERLIN, A.H., 1996. Sole haemorrhages and heel horn erosion in dairy cows - the influence of housing system on their prevalence and severity. *Acta Veterinaria Scandinavia, 37: 395-405.*
- BICKERT, W.G., 2000. Freestall design. *NRAES Dairy Housing and Equipment Systems Conference, February 1-3, Camp Hill, pp. 205-213.*

- BICKERT, W.G., HOLMES, B., JANNI, K.A., KAMMEL, D.W., STOWELL, R. and ZULOVICH, J., 2000. Dairy freestall housing and equipment. MWPS-7, 7<sup>th</sup> edition, MidWest Plan Service, Iowa State University, Ames, IA.
- BRAY, D.R., 1998. Cow comfort at the Feeding Area. NRAES Dairy Feeding Systems Management, components, and nutrients conference, NRAES-116, Cornell University, Ithaca, NY.
- BROUK, M.J., SMITH, J.F. and HARNER III, J.P., 2001. Heat stress abatement in four-row freestall barns. Procs. of the 5<sup>th</sup> Western Dairy Management Conference, April 4-6, Las Vegas, pp. 161-166.
- BROUK, M.J., SMITH, J.F. and HARNER III, J.P., 2003. Effect of sprinkling frequency and airflow on respiration rate, body surface temperature and body temperature of heat-stressed dairy cattle. Procs. of the 5<sup>th</sup> International Dairy Housing Conference, 29-31 January, Fort Worth, pp. 263-268.
- CALEGARI, F., CALAMARI, L. and FRAZZI, E., 2003. Effects of ventilation and misting on behavior of dairy cattle in the hot season in south Italy. Procs. of the 5<sup>th</sup> International Dairy Housing Conference, 29-31 January, Fort Worth, pp. 303-311.
- COOK, N.B., 2001. How good is sand bedding for your cows? Hoard's Dairyman, 146(18):667.
- FAULL, W.B., HUGHES, J.W., CLARKSON, M.J., DOWNHAM, D.Y., MANSON, F.J., MERRITT, J.B., MURRAY, R.D., RUSSELL, W.B., SUTHERST, J.E. and WARD, W.R., 1996. Epidemiology of lameness in dairy cattle: the influence of cubicles and indoor and outdoor walking surfaces. Veterinary Record, 139(6):130-136.
- GOOCH, C.A., 2000. Supplemental Cooling to Provide Heat Stress Relief For Northeast Dairy Cows - You Can't Afford Not To Do It! Pro-Dairy Program, Cornell University, Ithaca, NY.
- GOOCH, C.A., 2003. Flooring considerations for dairy cows. NRAES-148, Cornell University, Pro-Dairy Program, Ithaca, NY.
- GOOCH, C.A. and STONE, B., 2003. Improve cow performance and comfort with sound stall designs. Northeast Dairy Business, 5(4):24-25.
- GOOCH, C.A. and TIMMONS, M.B., 2002. Technology takes heat stress into account. Northeast Dairy Business, 4(6): 25-33.
- GRAVES, R.E., MCFARLAND, D.F. and TYSON, J.T., 1997. Penn State Dairy Housing Plans, NRAES-85, 2<sup>nd</sup> Edition, Cornell University, Ithaca, NY.
- GUARD, C.L., 2000. Environmental risk factors contributing to lameness in dairy cattle. NRAES Dairy Housing and Equipment Systems Conference, February 1-3, Camp Hill, pp. 271-277.
- HALEY, D.B., RUSHEN, J. and de PASSILLÉ, A.M., 2000. Behavioral indicators of cow comfort: activity and resting behavior of dairy cows in two types of housing. Canadian J. Animal Sci., 80:257-263.
- HARNER III, J.P., SMITH, J.F., BROUK, M.J. and MURPHY, J.P., 2000. Reducing heat stress in the



- holding pens. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Publication MF-2468, Manhattan, KS.
- HOLTER, J.B., WEST, J.W., MCGILLIARD, M.L. and PELL, A.N., 1996. Predicting ad libitum dry matter intake and yields of Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 79:912.
- JACOBS, E., 2003. Making the bed. *Northeast Dairy Business* 5(4):32-33.
- JUNGBLUTH, T., BENZ, B. and WANDEL, H., 2003. Soft walking areas in loose housing systems for dairy cows. Procs. of the 5<sup>th</sup> International Dairy Housing Conference, January 29-31, Fort Worth, pp. 171-177.
- KAMMEL, D.W., RAABE, M.E. and KAPPELMAN, J.J., 2003. Design of high volume low speed fan supplemental cooling system in dairy free stall barns. Procs. of the 5<sup>th</sup> International Dairy Housing Conference, 29-31 January, Fort Worth, pp. 243-254.
- LIN, J.C., MOSS, B.R., KOON, J.L., FLOOD, C.A., ROWE, S., MARTIN, J.R., BRADY, B., DEGRAVES, F. and SMITH III, R.C., 1998. Effect of sprinkling over the feed area and misting free stalls on milk production. *Professional Animal Scientist* 14:102-107.
- LIVESEY, C.T., HARRINGTON, T., JOHNSTON, A.M., MAY, S.A. and METCALFE, J.A., 1998. The effect of diet and housing on the development of sole haemorrhages, white line haemorrhages and heel erosions in Holstein heifers. *Animal Science* 67:9-16.
- McFARLAND, D.F., 2003. Freestall design – cow recommended refinements. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Dairy Housing Conference, January 29-31, Fort Worth, pp.131-138.
- PAJOR, E.A., RUSHEN, J. and PASSILLÉ, A-M., 2000. Cow comfort, fear, and productivity. NRAES Dairy Housing and Equipment Systems Conference, February 1-3, Camp Hill, pp. 24-37.
- PALMER, R.W. and BEWLEY, J.M., 2001. Here's the "bells and whistles" they added to their barns. *Hoard's Dairyman* 146(7):257.
- PALMER, R.W. and WAGNER-STORCH, A.M., 2003. Cow preference for different freestall bases in pens with different stocking rates. Procs. of the 5<sup>th</sup> International Dairy Housing Conference, January 29-31, Fort Worth, pp.155-164.
- SCHOONMAKER, K., 2002. Get a good groove. *Dairy Herd Management* 39(12):33-34.
- SHULTZ, T.A., 2002. Fan Cash. The Milk Lines, University of California Cooperative Extension, Tulare County.
- SPAIN, J.N. and SPIERS, D.E., 1998. Effect of fan cooling on thermoregulatory responses of lactating dairy cattle to moderate heat stress. Procs. of the 4<sup>th</sup> International Dairy Housing Conference, January 28-30, St. Louis, pp. 232-238.
- SPIERS, D.E., SPAIN, J.N. and SNYDER, B.L., 1998. Strategic night cooling of dairy cows during heat challenges reduces impact on thermal status. *J. Animal Science* 76 (Suppl. 1):103.
- SPIERS, D.E., SPAIN, J.N., LEONARD, M.J. and LUCY, M.C., 2001. Effect of cooling strategy and night temperature on dairy cow performance during heat stress. Procs. of the 6<sup>th</sup> International Symposium in Livestock Environment, May 21-23, Louisville, pp. 45-55.

- STOWELL, R.R., 2000. Heat stress relief and supplemental cooling. NRAES Dairy Housing and Equipment Systems Conference, February 1-3, Camp Hill, pp. 175-185.
- STOWELL, R.R. and INGLIS, S., 2000. Sand for bedding. NRAES Dairy Housing and Equipment Systems Conference, February 1-3, Camp Hill, pp. 226-234.
- STRICKLAND, J.T., BUCKLIN, R.A., NORDSTEDT, R.A., BEEDE, D.K. and BRAY, D.R., 1989. Sprinkling and fan cooling system for dairy cows in hot, humid climates. *Applied Engineering in Agriculture*, 5 (2): 231-236.
- TELEZHENKO, E.V., BERGSTEN, C. and MANSKE, T., 2002. Cow locomotion on slatted and solid floors assessed by trackway analysis. *Procs. of the 12<sup>th</sup> International Symposium on Lameness in Ruminants*, Orlando, pp. 417-420.
- TIMMONS, M.B., GATES, R.S., BOTTCHE, R.W., CARTER, T. A., BRAKE, J.T. and WINELAND, M.J., 1995. Simulation analysis of a new temperature control method for poultry housing. *J. Agricultural Engineering Research*, 62(4): 237-245.
- TUCKER, C. and WEARY, D., 2003. Neck rails: Raising the bar for cow comfort. University of British Columbia (UBC) Research Report 3(1), UBC Dairy Education and Research Centre, Agassiz, BC.
- TURNER, L.W., CHASTAIN, J.P., HEMKEN, R.W., GATES, R.S. and CRIST, W.L., 1992. Reducing heat stress in dairy cows through sprinkler and fan cooling. *Applied Engineering in Agriculture* 8(2): 251-256.
- VALDE, J.P., HIRD, D.W., THURMOND, M.C. and OSTERAS, O., 1997. Comparison of ketosis, clinical mastitis, somatic cell count, and reproductive performance between freestall and tie stall barns in Norwegian dairy herds with automatic feeding. *Acta Agricultura Scandinavia*, 38: 181-192.
- VERMUNT, J.J. and GREENOUGH, P.R., 1996. Sole haemorrhages in dairy heifers managed under different underfoot and environmental conditions. *British Veterinary Journal*, 152: 57-73.
- VOLKEY, F.J., GUARD, C.L., ERB, H.N. and GALTON, D.M., 2003. Observations on flooring and stall surface for dairy cattle housed in a free-stall barn. *Procs. of the 5<sup>th</sup> International Dairy Housing Conference*, January 29-31, Fort Worth, pp.165-170.
- WEARY, D.M. and TASZKUN, I., 2000. Hock lesions and freestall design. *J. Dairy Science*, 83: 697-702.
- WEDEL, A.W., 2000. Sand-laden dairy manure conveyance using screw conveyors. NRAES Dairy Housing and Equipment Systems Conference, February 1-3, Camp Hill, pp. 235-245.
- WEST, J.W., MULLINIX, B.G. and SANDIFER, T.G., 1991. Effects of physiological responses of lactating Holstein and Jersey cows during hot, humid weather. *J. Dairy Science*, 74: 840.

---

## EXTENSIVE LIVESTOCK PRODUCTION AND ENVIRONMENT

### BEEF CATTLE EXTENSIVE SYSTEM – TRADITION AND INNOVATION

C. J. REIS ROQUETE

Universidade de Évora, Dpt. de Zootecnia, Núcleo da Mitra, Apartado 94,  
7002-554 Évora; croquete@uevora.pt

*(Invited communication)*

#### ABSTRACT

The beef cattle extensive system is not a kind of innovative agricultural system, so we must taking in mind that the tradition has its place and will be the base for all kind of technical innovation. To understand the low productivity of the beef cattle extensive production, we have to show the irregularity of the mediterranean climate, the large amount of acid soils and by the way the seasonality of pasture growing. We put face to face the difficulties and risks of the weaned calves producers against the feed lots sector. At last the need of understanding by the people that are outside the extensive system for the consequences of PAC politics, what concern welfare and sustainable/durability of beef production.

**Key-words:** Beef cattle, extensive, management, PAC, welfare and sustainable production

#### INTRODUÇÃO

Esta minha conversa não se trata de uma lição (o que seria muito pretensioso da minha parte), mas nada mais que uma apresentação das razões da existência, dinâmica, problemas e um pouco de “futurologia”, acerca da produção de bovinos em extensivo.

O sector agro-pecuário leva muitos anos sujeito a crises, mas mantendo uma evolução permanente e, como em todas as crises, existem questões positivas e outras que não o são. O meio rural actual não tem nada a ver com o de épocas pretéritas, caracterizado por economias de autoconsumo e situações de algum servilismo, como os foros, os dízimos ou outras formas de produção por arrendamento a terceiros, não residentes neste mesmo meio rural. Hoje as coisas correm de um modo bastante diferente.

É um facto conhecido, por exemplo, que a população activa agrária diminuiu de forma importante e que na actualidade contamos com uma terça parte das pessoas que existiam nos anos 60, dedicadas à agro-pecuária.

E, na hora de analisar a realidade do meio rural (as zonas exploradas por sistemas extensivos, especificamente), convém destacar que a heterogeneidade territorial é acentuada: zonas económicas e sociais rurais cujo risco de despovoamento é baixo; outras de economia muito frágil em que devido às suas próprias características orográficas e produtivas, apresentam graves handicaps para seu desenvolvimento, e em que as densidades populacionais estão próximas ao deserto quase verde.

Neste sentido, o grande desafio é o de pôr em marcha mecanismos e instrumentos que permitam fixar população nestas zonas economicamente frágeis, tendo consciência que não existem soluções únicas e que será precisa a conjugação de toda uma série de actuações, complementares em si mesmas, que criem um “status” que permita não só eliminar a perda de população, mas criar um meio atractivo para o seu regresso e permanência. A decisão de se deslocarem, é um direito constitucional que os cidadãos têm, mas também têm o direito de ficarem e de encontrar oportunidades.

Gostaríamos que a exploração de bovinos em extensivo contribuí-se para tal !

Começaria por realçar os aspectos que entendemos como os mais demonstrativos do que é, e como deverá ser entendida, a exploração extensiva de bovinos (englobo aqui como co-autores, e como homenagem ao esforço e dedicação sobre o tema extensivo, os nossos vizinhos espanhóis, denominadamente a FEVEX – Federación de Productores de Ganado Vacuno Extensivo):

- ↑ Pela sua actualidade, a importância da exploração ganadeira extensiva como modelo de exploração ganadeira sustentável/durável;
- ↑ O compromisso, que todos temos, de fomentar e proteger a exploração extensiva (inclui os bovinos) como veículo de desenvolvimento rural e de conservação do meio ambiente;
- ↑ A importância da exploração bovina extensiva na conservação e melhoramento das raças autóctones, património genético de inquestionável valor, que temos a obrigação de transmitir às gerações futuras;
- ↑ A necessidade de equacionar a aplicação de novas tecnologias à exploração bovina extensiva, de acordo com as suas características próprias e os hábitos de manejo e gestão, de modo a que “sejam” mais competitivas;
- ↑ Não subestimar os usos e costumes do meio rural, pois eles representam sinais de identidade cultural e de arraigo de uma filosofia de vida “paredes meias” com a natureza.

## CARACTERIZAÇÃO E TRADIÇÃO

A produção extensiva de bovinos concentra-se (um perfeito paradoxo !), no nosso país, nas regiões de Trás-os-Montes, Beira Interior, Ribatejo, Alentejo e parte do Algarve, englobando, portanto, as áreas de pastoreio de montanha, planalto, montado e restolhos de cereais.

Significa, em termos de bovinos, que em condições de montanha e climas mais áridos, são as raças etiquetadas de rústicas que se fazem representar em maior escala (incluindo os correspondentes cruzamentos) :

- ↑↑ Barrosã, Maronea, Mirandesa, Arouquesa;
- ↑↑ Preta, Alentejana, Mertolenga;
- ↑↑ Brava.

Considerando que a produtividade e rusticidade são características que de alguma maneira podem chocar entre si e a existência de algumas crises nos sistemas tradicionais, impôs em muitas zonas, com meio produtivo específico (clima, solo, relevo, vegetação, etc.), que a exploração extensiva de bovinos tivesse presente que eram necessárias mudanças no tipo de animais utilizados, novas técnicas de conservação e selecção das raças locais ou autóctones, de modo a obter animais especializados para um aproveitamento adequado e integral . Deste modo podemos englobar algumas raças, denominadas exóticas, como adequadas e necessárias à manutenção dos sistemas extensivos:

- ↑↑ Limousine, Charolesa , Blond , Salers, etc.

Para que uma exploração extensiva de bovinos funcione, é necessário, antes de mais, que se dê o crescimento da pastagem, isto é, que existam temperaturas adequadas e humidade. As temperaturas invernais e sobre tudo as geadas, estabelecem logo a primeira limitação ao crescimento da erva, sendo a seca, no entanto, o aspecto mais limitante (e como somos “pródigos” neste aspecto !).

Admiram-se, alguns menos envolvidos e conhecedores do sector agro-pecuário, pela insistência com que aparecem os agricultores a pedirem ajuda para a seca. Não é com satisfação que falo disto, mas apenas para realçar a importância negativa deste aspecto meteorológico, cito o que aconteceu este ano em França. Tiveram uma seca e não houve ninguém que não reclamasse uma ajuda (Atenção: foram imediatamente atendidos.), e pensemos bem nisto, por se tratar de um país agrícola de alta capacidade produtiva, permitido pela existência de condições favoráveis - clima e solos, em que seria perfeitamente admissível que não fossem abrangidos pela ajuda pedida, uma vez que só tem

secas cada uma ou duas dezenas de anos, e, portanto, podendo diluir esse aspecto negativo nas receitas (bastante homogêneas) ao longo de vários anos. Um agricultor português, vive com secas cada 5 anos ou menos, tem os solos que tem, produtividade muito inferior, logo menos possibilidades de diluir os efeitos negativos da seca. Como diria o meu amigo Prof. Truman Martin (texano, vivendo e trabalhando em Indiana, pleno Cornbelt) depois de conhecer o Alentejo e Trás-os-Montes: como são artistas os agricultores destas regiões !.

Nas zonas de influência mais mediterrânea, com “Verões” longos, secos e com elevadas temperaturas; ou nas zonas planálticas e de montanha, de influência continental, com “Invernos rigorosos” e longos; é de prever a enorme matriz de durações das épocas de aproveitamento da erva. A irregularidade das precipitações, é outro dos factores muito importantes na produção extensiva de bovinos, pois introduz um factor de risco no planeamento deste tipo de expectativa produtiva, baseada em pastagens de sequeiro (e até em alguns lameiros).

Esta interacção: temperatura vs precipitação, faz com que os nossos períodos de crescimento da erva, a “Primavera” e “Outono”, oscile entre 3 a 6 meses (excepcionalmente 8 meses).

As espécies pratenses das zonas húmidas são, normalmente, do tipo perene (recrescem com as primeiras chuvas outonais, à custa das suas reservas radiculares), sendo mais produtivas que as anuais, por responderem rapidamente às condições favoráveis, no entanto, não persistem se o período estival for longo. Os sistemas extensivos do Sul, tem uma parte positiva (o arranque) e outra negativa e fatal (a manutenção), em termos de espécies pratenses mais produtivas (primeira diferença entre um extensivo Francês e um Português).

Para os nossos sistemas extensivos, e partindo da premissa que dentro de uma área concreta, com um clima determinado, é o tipo de solo quem determina as diferenças produtivas das pastagens, através da composição química e características físicas, entende-se melhor as dificuldades de garantir altas taxas de produtividade, devido aos tipos de solos que temos:

- a) solos pardos formados sobre rochas duras de silicatos (granitos), caracterizados por serem ácidos em grande percentagens (pH 4-5), extremamente pobres em matéria orgânica, com taxas de fósforo, azoto e cálcio assimilável muito baixo, profundidade de escassa a média, textura ligeira (arenosa-limosa), retendo por isso pouca quantidade de água, o que se traduz por problemas para a germinação, baixa capacidade de intercâmbio cationico (5 a 20 meq/100g), resultando em baixa retenção de elementos minerais e, portanto, baixa resposta à fertilização;

- b) ou sobre rochas metamórficas (xistos), com ligeiro aumento do pH e da capacidade de troca (15-25 meq/100g), textura pesada a média, tendo em geral melhoras características produtivas, mas em oposição o problema da formação de crosta superficial, dificultando a nascerça das sementes e respectivo enterramento ao início do período seco.

Em pequenas zonas mescladas com os solos pardos, podem aparecer solos de maior fertilidade que são o complemento, sob a forma de regadio ou de áreas de extensivo para produção de forragem de melhor e maior qualidade, dos sistemas extensivos de produção de bovinos.

A minha análise sobre o sistema extensivo de produção de bovinos, por defeito ou por “bairrismo”, terá por base a região alentejana, em que o montado não é mais que o bosque mediterrâneo transformado pelo homem para obter uma produtividade acrescida ao montado puro. Para isso se mantêm o montado original e se elimina o mato, de modo, que o solo subjacente, possa ser ocupado por pastagens e culturas (que indirectamente irão originar subprodutos para a produção de bovinos).

Menos positivo (em presença dos padrões de qualidade e ecologia actuais) foi a continuada lavoura destes solos, para semear cereais, mas não nos podemos esquecer que para os padrões tradicionais, estamos perante um actual “dois em um”: conseguir uma colheita de grão e limpar, com os trabalhos culturais, as pastagens. Depois de ceifados os cereais, criava-se outra fonte alimentar: os restolhos. Este processo repetia-se cada 6-8 anos.

Sem pretender discutir o tipo de rotação que mais se adequava a este sistema de produção, parece-me que a rotação C-F-P-P-P-P-P, preconizava em termos potenciais uma preservação de meio-ambiente (solos, pastagens, montado), isto é, um sistema sustentável ou durável, como actualmente tanto se apregoa como essencial. O Quadro I, é uma tentativa de prová-lo.

QUADRO I - ÍNDICES TEÓRICOS PARA ANÁLISE DE UMA ROTAÇÃO TIPO CEREAL - FORRAGEM-PASTAGEM (6).

Rotação	Cobertura do solo	Raizame	Estrutura	Competição	Trocas de azoto			Perdas relativas		Índice de produtividade sem
					incorporado	transferido	necessário	solo	proteção	
Cereal	-2	3	2	-1	3	4	-1	35	65	-2
Forragem	-2	3	2	-1	1	3	-2	60	60	1
Pastagem	1	3	3	1	1	0	1	10	90	1
Pastagem	1	3	3	1	2	0	2	5	95	1,25
Pastagem	1	3	3	1	2	0	2	5	95	1,25
Pastagem	1	3	3	1	2	0	2	5	95	1,25
Pastagem	1	3	3	1	2	0	2	5	95	1,25
Pastagem	1	3	3	1	2	0	2	5	95	1,25
Valores médios	0,25	3	2,75	0,5 (1)	1,875	0,875	1	15	85	0,77
com dedução de classe 3 (3 - 5 %)										0,385

É importante frisar, que o sucesso ou maneio adequado para um melhor aproveitamento do extensivo, passava pela utilização de várias espécies animais. No entanto, serão os bovinos que iremos analisar sem esquecer o “conjunto” utilizador do extensivo.

Os bovinos aumentaram a sua importância nos sistemas extensivos por razões que não se prendiam directamente a eles:

- ↑ Invasão de lãs neozelandesas, australianas e sul-americanas que provocaram a queda do mercado da lã e consequentemente a redução dos efectivos ovinos;
- ↑ A aparição da peste suína africana com imediata redução dos efectivos de porcos explorados em extensivo;
- ↑ Redução do valor da lenha com o consequente menor controle do montado;
- ↑ Redução da mão-de-obra.

Com todos estes “acidentes”, o sistema extensivo, evoluciona, mudando a orientação produtiva, conduzindo a:

- ↑ Menor utilização de mão-de-obra;
- ↑ Maior mecanização;
- ↑ Simplificação dos sistemas.

Os empresários do extensivo, com maior ou menor relutância arriaram caminho e, hoje, podemos dizer que uma estrutura empresarial típica actual, de produção de bovinos em extensivo, tem cerca de 95 % de superfície em sequeiro puro, dos quais entre 30-60 % se podem considerar como não laboráveis, sendo a base da produção bovina; ficando as melhores zonas para culturas arvenses e forrageiras (esta a grande melhoria do sector de produção de bovinos).

Com isto o empresário conseguiu uma diversificação dos riscos e, mais importante, um complemento alimentar para o gado durante os períodos críticos: Verão-Outono-Inverno.

No título da palestra existem as palavras “tradicional” e “inovação”, e pergunto:

a) será que evoluímos em termos técnicos de uma para outra, quanto à produção de bovinos em extensivo, ou ficamos pelo compromisso ?

b) quando “fulano”, um produtor de bovinos no extensivo, diz : vou reduzir a área dedicada ao cultivo de cereais, aumentar a área de pastagens e melhorá-las com ajuda de adubos ou, semear pastagens novas de acordo com as possibilidades dos terrenos, de modo a me garantir pelo menos 80-90 % das



necessidades da vacada; ou quando “beltrano”, outro produtor de bovinos, diz : como a produção de erva na minha exploração é bastante irregular e estacional, penso conveniente cultivar com cereais uma área adequada, para garantir uma produção mínima de alimentos complementares para as fases críticas de Verão-Inverno. Estaremos a ouvir uma conversa dos anos 60 ou 90 ?

c) As figuras 1 e 2 terão sido desenhadas por um criador de bovinos no Alentejo nos anos 60 ou pelos descendentes desse mesmo criador nos anos 90?

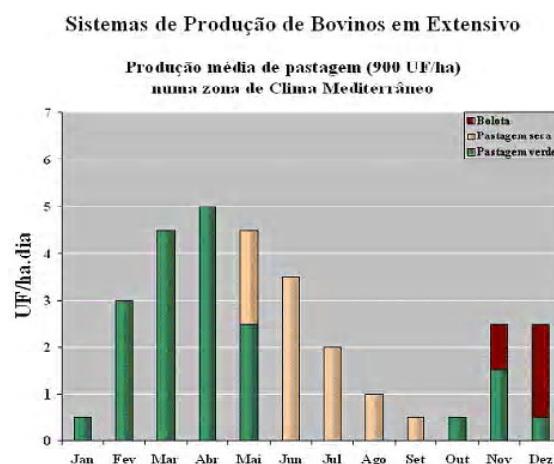


Figura 1. Curva tradicional de produção de erva.

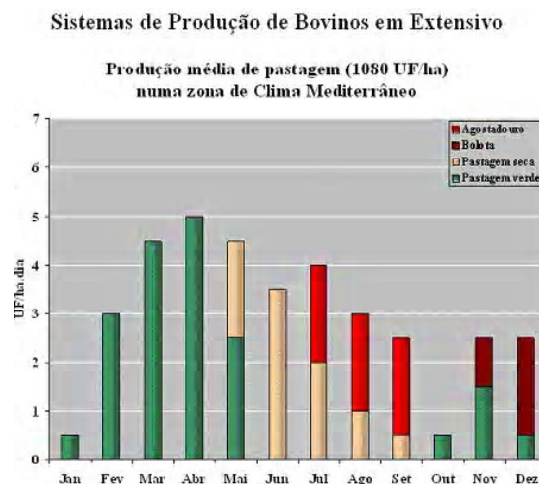


Figura 2. Curva tradicional de produção de erva com utilização de restolhos.

Agora, o que vou dizer, tenham a certeza que tanto respeitaria aos anos 60 como aos 90. Senão vejamos:

- ↑ As pastagens naturais no Sul podem produzir entre 450-1200 UF/ha, segundo a qualidade do solo e as condições climáticas;
- ↑ Em termos médios, 60% das UF produzidas pela pastagem se consomem em verde e nunca para lá de Maio;
- ↑ Existe um período médio de 4 meses em que pára o crescimento da erva, como consequência das elevadas temperaturas e escassez de pluviosidade;
- ↑ O crescimento outonal pode ser quase nulo ou produzir cerca de 20% das UF totais, dependendo da ocorrência de chuvas cedo;
- ↑ Normalmente o excesso de produção de Primavera não é ganhado, devido à baixa altura da pastagem, dificuldades de mecanização, ficando deste modo no pasto, para ser comido seco pelos bovinos;
- ↑ O nível de ingestão da pastagens seca está directamente proporcional à existência de leguminosas e portanto de azoto.

Será dentro deste quadro de premissas que a produção bovina extensiva terá de equacionar o manejo, de modo a obter uma rentabilidade, que seja justa para o esforço nela gasto pelo empresário (trabalho, capital, preservação do meio-ambiente, etc). Como se verá a seguir não é muito fácil (figuras 3, 4 e 5).

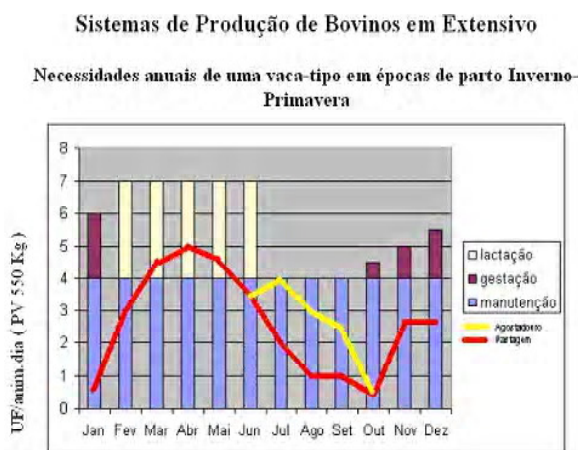


Figura 3. Curvas das necessidades de uma vaca tipo com parto em Fevereiro e a produção de erva por hectare.

# Sistemas de Produção de Bovinos em Extensivo

Necessidades anuais de uma vaca-tipo em épocas de parto Verão - Outono

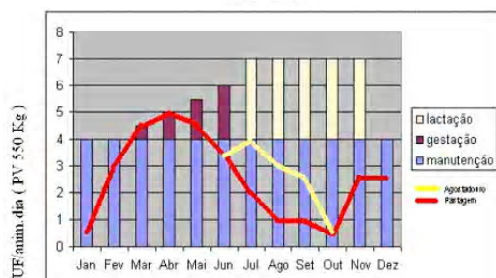


Figura 4. Curvas das necessidades de uma vaca tipo com parto em Julho e a produção de erva por hectare.

# Sistemas de Produção de Bovinos em Extensivo

Necessidades anuais de uma vaca-tipo em épocas de parto de Outono - Inverno

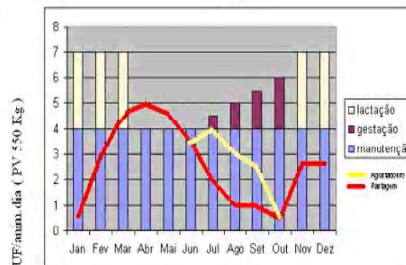


Figura 5. Curvas das necessidades de uma vaca tipo com parto em Novembro e a produção de erva por hectare.

Além das dificuldades focadas têm sido sistematicamente e/ou praticamente esquecidos os riscos do produtor de vitelos ao desmame, principalmente em condições extensivas. E, no entanto, eles contribuíram para o êxito dos engordadores, ao realizarem selecção/escolha de raças mais produtivas em termos de velocidade de crescimento e eficiência alimentar, melhorando as raças autóctones, base de todos os cruzamentos e, paradoxalmente, ficaram dependentes dos preços do jogo da procura e oferta, por terem realizado um tipo de “harakiri” muito “sui generis”.

- ↑ melhoraram o tipo de vitelo ( mais quilos de peso vivo ao desmame);
- ↑ vendem vitelos em melhor estado sanitário (mais viabilidade pós-desmame);
- ↑ melhoraram o manejo alimentar das vacadas (melhor eficiência reprodutiva, logo mais vitelos);
- ↑ praticam técnicas de concentração de partos (mais vitelos: melhores e mais pesados);
- ↑ praticam rotações adequadas (preservação do meio-ambiente e portanto, investimento altruísta);
- ↑ mas fatalmente, criaram pontos sazonais de maior oferta (logo menor preço para tanto esforço financeiro).

Como não fosse suficiente o exemplo anterior, olhemos para um pseudo raciocínio sobre a dimensão dos riscos de produção, nos sistemas de produção de vitelos em extensivo e consequente sector da engorda:

- ↑ A nível da engorda e acabamento temos riscos de mortalidade de 3-4 %;

- ↑ Existe mercado imediato para substituir estas baixas, repondo a situação normal;
- ↑ O engordador/intermediário, nesta situação pagará mais (procura pontual);
- ↑ O engordador/acabador, consegue manter o número e qualidade pré-acordada;
- ↑ Quase diria que os riscos são nulos excepto numa fase de crise instalada;
- ↑ Um engordador pode contrapor que trabalha com margem mais estreitas de preços e com técnicas produtivas muito mais caras (instalações, alimentos, etc);
- ↑ Mas os engordadores têm a quem transmitir o “choque eléctrico”, de uma perda de receita, o “bom” do produtor de vitelos ao desmame (o nosso sistema extensivo de produção de bovinos é um deles).

#### Mudemos agora de sub-sector produtivo

- ↑ A nível da vacada temos mortalidade de 3-5 % dos vitelos até desmame;
- ↑ No mercado não existe oferta para um vitelo substituto ou adoptado (primeira não resolução do risco ou satisfação de um compromisso de venda);
- ↑ Mas a culpa pode ser da falta de cuidado ou menor técnica de maneio ou parto difícil;
- ↑ Mortalidade dos vitelos ao parto, em média 4-6 %;
- ↑ Aqui ainda talvez fosse possível resolver parcialmente o problema (técnica de opção. Ideal);
- ↑ Mas mais uma vez a culpa pode ser do criador (faltou ajuda ao parto ou o touro ou linha de vacas não são adequados);
- ↑ Mortalidade fetal cerca de 2-3 %;
- ↑ O criador nem no vitelo pode pensar como receita e ainda teve uma vaca alimentada, correctamente ou não, que lhe deu apenas despesa
- ↑ Não vejo como substituir esta vaca por outra e garantir o vitelo;
- ↑ Mas os riscos ainda continuam e, aqui, é que não haverá nada a fazer: é que apenas 85 % das vacas ficaram gestantes (e os investimentos tinham sido pensados para 100 % de partos com êxito).

Como corolário desta situação negativa, não existe a possibilidade de o criador fazer repercutir este insucesso parcial, no aumento do preço de venda

---

dos vitelos restantes, porque o intermediário, não tem culpa do sucedido, nem tentar comprar os alimentos a menor preço, porque também fábrica de rações ou o vendedor de palhas ou forragens não tem culpa disso. É o fado !

## TENDÊNCIA

Qualquer que seja a futurologia que eu possa tentar fazer sobre a importância da produção bovina em extensivo, já outros a fizeram e até há muitos anos antes:

- ↑ Reid afirmou que no século vinte um, os ruminantes alimentados com produtos não competitivos serão a fonte primeira de produção de proteína animal para o homem;
- ↑ Fitzhugh apontava para o seguinte: “ a competição cada vez maior por recursos não renováveis, como terra, água e petróleo, faz com que a produção de ruminantes (bovinos um deles), dependa cada vez mais das pastagens (mas menos mecanizáveis), subprodutos e de outros recursos não competitivos com a alimentação humana.

No entanto, continua a resultar bastante difícil fazer uma previsão de qual pode ser o futuro do sector da bovinotecnia extensiva, porque são muitas as cabeças e mais as ideias, isto é:

- ↑ Uns apontam para uma necessidade de reestruturação a fundo;
- ↑ Outros entendem que já deveria ter sido feita de um modo paulatino;
- ↑ Outros dizem que estão descapitalizados para o fazer;
- ↑ Outros dizem que foi esbanjado dinheiro comunitário, e pouco foi reconvertido;
- ↑ Outros dizem que são baixas as perspectivas de rentabilidade, logo não reconvertem adequadamente.

Uma coisa, no entanto é certa, as premissas/objectivos em termos teóricos de décadas anteriores mantêm-se actuais para o sector da ganadaria extensiva:

- ↑ Escolher alternativas segundo um critério de produtividade, mas pensando em explorações bem dimensionadas, para enfrentar um futuro de energia escassa e cara e a competição elevada no sector;
- ↑ Dar prioridade às alternativas que conduzam a mais postos de trabalho (paradoxo);
- ↑ Manter e até incrementar a produtividade da terra, sem contribuir para a erosão (pressão de quem mais polui para desviar atenção !);
- ↑ Tentar colocar o sector a produzir sem excesso nem déficit (é como tentar encontrar a mulher ou o homem ideal).

Do meu ponto de vista, e de muitos outros, acredito que a produção de bovinos em extensivo, tem ainda possibilidades de transformação e de desenvolvimento, desde que a inovação seja bem racional, com adequado apoio técnico, não desdenhando dos conhecimentos tradicionais, com simplificação do manejo, mas incrementando a fertilidade das vacadas sob forte contributo dos alimentos produzidos na própria exploração.

Um dos pontos charneira do futuro da bovinotecnia extensiva continuará a ser a disponibilidade de alimentos baratos. Este é um factor limitante da existência destas explorações, pois estamos falando de produtividade baixa 0,7 a 0,8 vitelos desmamados por vaca, em condições boas de alimentação e manejo.

Esta situação real dos sistemas extensivos faz que o efeito “pescadinha de rabo na boca” esteja sempre presente: não se pode utilizar muitos alimentos complementares, caso das forragens e concentrados por serem bastante dispendiosos, mas também não se conseguirá alimentar adequadamente a vacada e, portanto, contribuímos para a quebra da eficiência reprodutiva, logo menos vitelos, menos receitas e menos vontade de utilizar alimentos complementares

### **INOVAÇÃO COMO COMPLEMENTO DA TRADIÇÃO**

Todas as inovações no campo da produção de bovinos (extensivo e não só) têm “permitido” algumas crises. Numa tentativa sã para que deixem de perturbar o sector agro-pecuário, inovou-se com a nova reforma da PAC.

Os objectivos da reforma da PAC – 2000, passam pela:

- ↑↑ Competitividade da agricultura comunitária;
- ↑↑ Mercado orientado;
- ↑↑ Agricultura sustentável/durável;
- ↑↑ Desenvolvimento rural forte.

E partindo de um princípio que os objectivos serão concretizados, as perspectivas, tendo por base uma Europa a 15, são do ponto de vista da Direcção Geral de Agricultura da Comissão Europeia as seguintes:

- Maior competição de outros cereais para alimentação
- + Quebra da produção de forragens conservadas, caso da silagem (7 %)
- + Menor produção de cereais (2,1 %)
  - = Menor área semeada (procura melhores solos e maior produção
  - = Melhores preços dos cereais
  - => Indirectamente redução dos incentivos á produção intensiva de carne de bovino
- + Aumento do set-aside voluntário (30 %)

- + Abandono da produção
- + Diminuição das vacadas (14 %)
  - = Menor produção de carne bovina (2,7 %)
  - = Mais terra para alimentar menos bovinos
  - => Sistemas mais sustentáveis/duráveis
  - => Melhores preços para a carne bovina (7,1 %)
  - => Sistemas de produção de bovinos em extensivo

No entanto, continua a ser inimaginável a dimensão da dependência, perante uma Comunidade Europeia, dos sistemas de produção de menor produtividade por ha ou por CN, e as continuadas críticas dos países ricos, etc, mas no fundo, todos eles sonham com um campo mais ou menos ondulado, com distribuição adequada de árvores e uns bovinos recortados no horizonte ... (como consigo disfarçar este meu facciosismo!)

É este sistema extensivo de produção de bovinos que o Alentejo, Beiras e Trás-os-Montes representam, que responde melhor que nenhum outro, ao paradigma da agricultura multifuncional que deveria ser fomentado pela PAC.

O calcanhar de Aquiles continua a ser a comercialização dos produtos derivados das explorações de bovinos em extensivo, por ser, em linhas gerais, deficiente e inadequada.

Os produtores de vacadas comerciais, deveriam seguir o exemplo dos agrupamentos de produtores ligados às raças autóctones, e passando a publicidade, pôr os olhos na MONTADOALENTEJANO E TRADIÇÃO, como exemplo de um esforço cooperativo de produção, mas principalmente de comercialização. Deverá haver, mais que a tão apregoada modernização técnica, um esforço de todas as administrações com competência na matéria (estatais – pensando no bem comum; e particulares – pensando no bem do sector) para fomentar uma melhor comercialização e distribuição destes produtos, quer através de marcas de qualidade, sem ambiguidades de interpretação, ou quer através de produto, mesmo sem um título ou marca, que o seja, isso sim, um produto de qualidade, de modo que cada vez mais, sejam reconhecidas e apreciadas pelo consumidor (de médio a alto poder de compra ou de bolsa reduzida, respectivamente).

Temo-nos debruçado quase exclusivamente sobre o papel do criador de bovinos de carne em extensivo, mas também a Administração Central ou os representantes dos principais partidos políticos, com lugar em Bruxelas, é essencial que saibam explicar e afrontar (no bom sentido) de maneira decidida e valente, as características diferenciais dos nossos sistemas de produção extensivos frente aos de alguns dos nossos sócios comunitários, também denominados extensivos

(só pelos animais andarem no campo). Só assim, os criadores do extensivo poderão estar de acordo com algumas das reformas (ou melhor entendê-las), e não se convertendo num sector seguidista de políticas que nada têm que ver com a produção de carne de bovino extensiva, quando englobados num mercado globalizado.

Outra inovação, o “desligamento” às ajudas directas, deixa segundo a opinião de alguns, numa situação de indefesa aos produtores de vacas “aleitantes”, em geral, e aos produtores dessas mesma vacadas quando exploradas em extensivo, em especial. Além de consolidar a discriminação existente entre ganadeiros que tiveram ou nunca tiveram acesso aos prémios e, com esta reforma, tão pouco a eles irão poder ter acesso.

O sector bovino está caracterizado por ser constituído por dois subsectores bem diferenciados: o sector produtor de vitelos, representado fundamentalmente pelas vacadas “aleitantes” e aquele dedicado à engordas dos mesmos, de modo que o primeiro proporciona ao segundo os animais para a engorda e acabamento.

Até ao momento, nas operações normais de intercâmbio (compra e venda) entre os dois subsectores mencionados, o prémio ao bovino macho, actuava como amortecedor da pressão de compradores sobre vendedores, de modo que num dado momento o produtor de vacas “aleitantes” poderia decidir prolongar a recria ou engorda e cobrar o prémio se os intermediários/recriadores/engordadores optassem por pagar mal.

Com a nova proposta, a situação muda radicalmente, porque o “alforge” (subsídio ou ajuda comunitária) ficará nas mãos dos engordadores, que cobravam tradicionalmente o prémio ao bovino macho. Os donos das vacadas não têm elementos com que pressionar a fixação dos preços e ver-se-ão obrigados a suportar os cortes nos preços que se transmitem ao longo da cadeia da carne bovina. Como último elo da cadeia, o produtor de vitelos não pode fazer repercutir esses cortes ou descida de preços em outro operador, e deste modo não pode amortecer as perdas.

Este é o cenário que se apresenta, do ponto de vista de grande parte do sector, se houver “desligamento” total do prémio ao macho. O sector terminal da produção de carne de bovino ficará reduzido a algumas grandes engordas intensivas que se abastecerão, principalmente de animais importados.

Existe alguma consciência que os pagamentos ao sector de produção de bovinos em extensivo devia ser mediante o estabelecimento de uma ajuda única à vaca “aleitante”, mantendo-se a extensificação como forma de premiar os sistemas extensivos, geradores de qualidade ambiental, bem-estar animal e de produtos de qualidade.

Uma coisa será certa, o criador de vitelos terá que regatear o preço com o



intermediário ou engordador. Esta não é mais que uma consequência de um ensinamento básico da economia elementar em tempos de liberdade de mercado: o engordador não decide pagar nem bem nem mal, mas são os mecanismos de oferta e procura os que determinam os preços, de maneira idêntica à de todos os mercados não intervencionados.

No entanto, e a juntar a isto, o produtor continuará querer ter acesso às ajudas PAC, mas para isso, ele deverá demonstrar o cumprimento de um sem fim de compromissos de índole ambiental, trabalho, sobre o bem-estar animal, sobre segurança alimentar, etc., pelo qual ter-se-á de converter num verdadeiro “expert” em tramitação e gestão de papéis se quer ter acesso a essas ajudas.

## INOVAÇÃO E SUSTENTABILIDADE

Um dos problemas dos actuais sistemas extensivos de produção está ligado aos sucessivos anos de produção objectiva para a produtividade da unidade terra ou hectare, como a alternativa última para quem estivesse no sector primário produtivo e ao mesmo tempo a solução das matrizes de optimização.

Muito se tem dito sobre o não aproveitamento das ajudas comunitárias, no sector extensivo, mas uma análise dos census, quase me dá direito de dizer que: é mais fácil falar do que analisar - teoria do papagaio !. (Quadro II)

QUADRO II - ANÁLISE PARCIAL, DA UTILIZAÇÃO DAS AJUDAS COMUNITÁRIAS NOS SISTEMAS AGRO-PECUÁRIOS.

### Sistemas de Produção de Bovinos em Extensivo

#### A teoria do papagaio

	Nº Explorações			Área (ha)			sustentabilidade na óptica da produção extensiva	
	ano		variação (%)	ano		variação (%)		
	1989	1999		1989	1999			
								produtor
Culturas permanentes com pastagens permanentes	1 077	5 079	371,6	7 108	33 020	364,5	+	++
Pastagem permanente em terra limpa	3 809	6 097	60,1	128 295	272 552	112,4	+/-	+++
Matas e florestas sem culturas sob coberto	6 172	5 689	-7,8	133 649	189 788	42	+	+/-
Pastagens permanentes sob coberto	3 469	5 503	58,6	266 194	512 729	92,6	+	++
Culturas temporárias sob coberto	3 416	2 426	-29	133 499	85 955	-35,6	+/-	+
Diversificação/outras culturas	41 825	28 596	-31,6	23 734	30 892	30,2	++	+++
			explorações			nº animais		
Vacas leiteiras			-75,1			-12,1	+/-	+/-
Vacas de carne			-20,5			102,9	+	+

Censo Agrícola ( Alentejo 1999 ) - adaptação

Agora para desanuviar o ambiente, só espero que ferrenhos adeptos da teoria da sustentabilidade não vejam na foto 1 um dos melhores exemplos da

destruição do meio-ambiente, no que diz respeito aos sistemas extensivos e na foto 2, o melhor exemplo de uma exploração extensiva, garante da sustentabilidade e rigor ecológico.

#### **Sistemas de Produção de Bovinos em Extensivo**



Fotografia 1. Será isto um exemplo de craga animal exagerada?

#### **Sistemas de Produção de Bovinos em Extensivo**



Fotografia 2. Será isto um exemplo de sustentabilidade?

Em síntese, o momento actual da bovinotecnia extensiva terá de basear-se no:

- ↑ Aproveitamento económico e durável das condições naturais.
- ↑ Existência de situações históricas com tanto peso como a anterior.
- ↑ Dimensão e capital da empresa.
- ↑ Disponibilidade de conhecimento técnico:
  - Próprio;
  - Contratado;
  - Disponibilizado.
- ↑ Situação geográfica e interligação ao meio envolvente, os factores socio-económicos:
  - Enquadramento da mão-de-obra;
  - Estado e quantidade das comunicações;
  - Existência ou proximidade dos mercados.
- ↑ Política Agrícola Comum (PAC).

## INOVAÇÃO E CONTRA-SENSO

Não será esta reforma um paradoxo em si ?

- ↑ queremos mais gente na terra e apontamos para explorações familiares, impedindo indirectamente a entrada de técnicos (modernização)
- ↑ com a aplicação de históricos em termos de ajudas, não conseguimos que os espíritos mais modernos entrem para o sector, por manifesta inferioridade logo à partida, por não conseguirem competir com os já instalados
- ↑ não será o papel do Estado cada vez mais interventivo, precisamente o contrário que se pretende, numa política de globalização.

Por outro lado, não se entende bem as causas da rapidez na reforma do sector bovino de extensivo, já que houve uma em 2000, com resultados adequados e positivos em 2002, e não gerando excedentes de produção. Paralelamente, é consciência do sector, que cumpre com o respeito ao meio-ambiente, à biodiversidade, ao bem-estar animal, ao aproveitamento dos recursos pascícolas e, talvez com lacunas, na segurança alimentar. Mas, no entanto, existe todo um esforço das Associações de Criadores e a carne de bovino produzida, praticamente toda ela se comercializa pelos correspondentes agrupamentos e por marcas protegidas e reconhecidas

As tentativas de inovação, no sector da produção de bovinos em extensivo, por “leviandade”, podem em algumas situações, confundir e espantar quem está directa ou indirectamente ligado ao sector, vejamos:

- ↑ Vitelos cruzados que aparecem em leilões com 200 kg de peso vivo e 3-4 meses de idade;
- ↑ Vacas puras de raças autóctones que garantem 1,500 kg e mais de GMD aos seus vitelos até ao desmame;
- ↑ As novilhas verdadeiramente de substituição, de vacadas com partos tradicionais no Alentejo (Jul-Ago-Set-Out), não podem ser inscritas como vacas aleitantes, porque não pariram na altura da inscrição, nem como fazendo parte dos 15-40 % de animais de substituição porque, como é lógico, e se deseja, vão parir no período de retenção.

Além disso, existe também alguma confusão entre a realidade produtiva e as vontades angélicas de protecção animal, chegando ao ponto de haver queixas de grupos de protecção e bem estar animal sobre situações de produção indignas para bovinos explorados em extensivo.

Dentro da reforma da PAC, que acaba de ser aprovada, são incluídas ajudas aos ganadeiros que favoreçam o bem-estar dos animais. Para receber estas ajudas, haverá um compromisso, durante um período mínimo de 5 anos, de aplicar critérios de bem-estar animal, e não cumprimento destes requisitos pode conduzir a redução dos pagamentos directos, proporcionalmente aos riscos e danos que se tenham produzido.

Esperamos e desejamos, que a visita dos controladores, em plena época de aproveitamento dos restolhos de cereais na zona de Castro Verde, não gere uma queixa, por deficiência de cumprimento do bem-estar animal, uma vez que os animais foram encontrados a alimentarem-se em pleno campo, sem uma sombra. Coitados !

Ou como será a actuação de um controlador de bem-estar e sanidade animal, quando um criador de bovinos em extensivo, não identifica os seus vitelos no prazo de 20 dias, no final da Primavera e no Verão, porque não quer ter o vitelo a sofrer, por ter as orelhas rasgadas, infectadas, cortadas e, mais grave, enterrado (desculpem, agora diz-se “carregado”, “roubado” ou “desaparecido”);

Não se trata de palavras vãs nem tão pouco provocadoras, é que já temos exemplos.

Os agentes da uma organização ligada ao bem estar animal, aqui na vizinha Espanha, denunciaram ganadeiros por terem as suas vacas no campo no dia 15 de Janeiro, dia em que os campos se encontravam nevados e havia

temperaturas abaixo zero, e que no entender destes agentes se infringia o Regulamento de Sanidade Animal por não “atender e vigiar seus animais para manter o seu bom estado sanitário e de bem estar”.

Quantas situações destas, contribuirão para o descrédito da produção, por elementos que nada ou pouco sabem, mas que injectam a opinião pública e fazem com que alguns no sector produtivo desmoralizem, pelos problemas burocráticos que os serviços lhes impõem desnecessariamente.

No entanto, a resposta para este caso concreto foi lapidar:” ... *alguém está perdendo o sentido neste país, sataniza-se ao ganadeiro que, fazendo o que tem feito toda a vida, tem o seu gado no campo inclusivé quando neva e faz frio, e pelo contrário nos mostramos impassíveis perante as centenas dos sem abrigo que cada noite dormem sujeitos às intempéries em qualquer cidade.*”

---

## **IN VIVO AND IN VITRO TECHNIQUES TO ESTIMATE FERMENTATION AND DIGESTION IN RUMINANTS**

**J.W. CONE**

ID TNO Animal Nutrition, Lelystad, The Netherlands

*(Invited communication)*

### **ABSTRACT**

There are several methods to measure the degradability of organic matter in the rumen and the intestine, each with its own possibilities and disadvantages. Early research on degradability was done by feeding the animals and analysing the excreta and recording animal performance. Later on surgically modified animals became available, facilitating research to determine the degradability in different parts of the gastrointestinal tract. The nylon bag technique is intermediate between *in vivo* and *in vitro* experiments, as porous nylon bags are incubated in the rumen. Bags can be removed from the rumen through the rumen cannula and the residue can be analysed chemically. By incubating the bags for different periods the rate of degradation of different chemical components can be determined. In many countries the nylon bag technique currently is the standard technique on which feed evaluation systems for ruminants are based. To overcome the disadvantages of *in vivo* techniques alternative techniques, based on rumen fluid and enzyme preparations, have been proposed. Early techniques were meant to estimate the extent of organic matter degradation in the animal. However, to optimise ration composition and to minimise undesired emissions, there is an increasing need for kinetic parameters of degradability. In the past decade the gas production technique proved an excellent tool to determine accurately the degradation kinetics caused by microbial fermentation in the rumen. The possibilities of the gas production technique to investigate rate and extent of organic matter degradation are discussed in this paper.

**Key-words:** Digestion, fermentation, *in vivo* and *in vitro* techniques, ruminants

### **RESUMO**

Existem diversos métodos para estudar a degradabilidade da matéria orgânica no rúmen e intestino grosso, apresentando cada um deles vantagens e desvantagens. Inicialmente, os trabalhos de pesquisa nesta área eram realizados alimentando os animais, analisando os excreta e registrando a performance animal. Mais tarde, a utilização de técnicas de cirurgia possibilitou a aplicação de cânulas, facilitando a

obtenção de dados em diferentes zonas do tracto gastro-intestinal. Na técnica dos sacos de nylon, os sacos são incubados no rúmen, por períodos de tempo variáveis, e o resíduo é analisado quimicamente, permitindo a determinação da taxa de degradação de diversos compostos químicos. Em muitos países este método é actualmente utilizado como técnica padrão no desenvolvimento de sistemas de avaliação nutricional para ruminantes. De modo a ultrapassar algumas das desvantagens das técnicas *in vivo*, métodos alternativos, baseados na utilização de licor de rúmen e misturas enzimáticas, foram propostos. Inicialmente destinadas a estimar a extensão de degradação da matéria orgânica, estas técnicas evoluíram, permitindo analisar diversos parâmetros de cinética de degradação. Na década passada a técnica da produção do gás provou ser uma ferramenta adequada para o estudo da cinética de degradação, através da medição dos níveis de fermentação microbiana. As possibilidades da técnica da produção do gás para investigar a taxa e a extensão da degradação da matéria orgânica são discutidas neste artigo.

**Palavras-chave:** Digestão, fermentação, técnicas *in vivo* e *in vitro*, ruminantes

## ANIMAL EXPERIMENTS

Determining the feed value in ruminants can be done in different ways, with intact animals and with surgically modified animals. With intact animals the utilisation of a feed and its chemical components can be determined by relating the amount and chemical composition of faeces and urine (and milk) with the intake. These trials are most easily performed with dry cows or sheep fed at maintenance to prevent body growth, complicating the interpretation of the results. Alternatively animal trials also can be performed with producing animals to investigate the impact of different feeds or ration compositions on the production level and quality. Although, simple and being in use for a long time, animal trials and performance trials are the ultimate experiments to test feeds and rations and the ultimate validation of all alternative techniques. However, the total tract digestibility determined with the animal trials is not the true digestibility, but is called the apparent digestibility. Part of the organic matter in the faeces is not a residue of the feed but is excreted by the animal's body, i.e. enzymes and gut cells.

Animal trials do have restrictions in their use. Only a few forages, under certain circumstances, can be tested as a complete ration. All other forages and concentrate feed ingredients can only be tested as part of a total ration. As trials with intact animals have their restrictions, investigators searched for more than half a century for alternatives. Alternatives were found by *in vivo* trials with cannulated animals, giving more detailed information on the site and rate of degrada-

tion, and animal experiments in which feeds are incubated in porous nylon bags in the rumen.

First attempts to predict feed value were done in the second part of the 19th century, by comparing feed quality with that of a standard straw or hay. In the same period chemical methods to characterise forages were developed at the Weende experimental station in Göttingen in Germany. In the beginning of the 20th century feed quality was compared to standard starch, as starch quality was more constant than that of hay and straw. Later on systems were based on standards of barley and oat.

To study the digestion physiology in the different parts of the gastrointestinal tract, animals can be supplied with different cannulas. Most applied and well known is the rumen cannula, but intestinal cannulas in the duodenum and ileum are also applied. This makes it possible to study the microbial physiology in the rumen, but also the passage out of the rumen can be studied by measuring and analysing the flow at the duodenum. By analysing the flow at the duodenum and ileum the digestion in the small intestine is measured. Comparing intake and duodenal flow gives information on the degradation in the rumen and stomachs and comparing ileal flow and faeces composition gives a measure for the colon fermentation. Rumen cannulated animals are also used for experiments with the nylon bag technique. Duodenal and ileal cannulated animals are used for mobile nylon bag techniques, providing data on the digestion in the small and large intestine.

### ***IN SITU* TECHNIQUES**

In the seventies the in situ technique with nylon bags was developed by the group of Ørskov (Mehrez and Ørskov, 1977; Ørskov and McDonald, 1979). Although the technique was initially developed to determine rate and extent of protein fermentation in the rumen it is also widely used to determine degradation kinetics of other chemical constituents (Ørskov, 2000). The rumen nylon bag technique is currently the standard technique for ruminant feed evaluation systems in many countries.

Nylon bags are filled with sample and inserted in the rumen through a rumen cannula. After different incubation periods the nylon bags are withdrawn from the rumen. By analysing the residue in the nylon bags it is known how much of the content has been degraded during the incubation period. By analysing different incubation periods, the dynamics of degradation can be calculated. Degradation curves are normally fitted with an exponential model (Robinson et al., 1986). As



the nylon bags have pores of  $\pm 40 \mu\text{m}$ , particles smaller than  $40 \mu\text{m}$  can be washed out from the bags. The technique is not able to describe the degradation characteristics of this washout fraction. The washout fraction can be large for starch and protein. In most feed evaluation systems the washout fraction is regarded as highly degradable.

Normally chemical constituents of feed samples are divided into three fractions, the washout fraction (W), the undegradable fraction (U) and the potential degradable fraction (D), which is  $100 \% - W - U$ . The size of the W-fraction is determined with separate bags washed in a washing machine, without being incubated in the rumen. The undegraded residue in the nylon bags after prolonged rumen incubation (often 14 days) is regarded as the U-fraction. Alternatively the U-fraction can be calculated from the degradation curves by extrapolation to indefinite incubation periods. The degradation of the D-fraction is fitted with an exponential model and the rate of degradation (kd) is expressed in %/h.

Although the bags are much smaller, the mobile nylon bag technique makes use of the same nylon gauze as the rumen nylon bag technique. Bags are inserted into the duodenum through a duodenal cannula and pass the small and large intestine and are recovered from the faeces. Often bags are pre-treated with rumen fluid and an acid pepsin solution. Vanhataloo (1995) investigated the influence of different parameters on the mobile bag procedure. The mobile nylon bag technique is not very often applied, as surgically modified animals are needed. The technique is applied to determine the true digestibility of protein and starch in the intestine.

## **ENZYMATIC IN VITRO TECHNIQUES**

The advantage of enzymatic techniques to determine degradability over rumen fluid based techniques is that enzymatic techniques are easy to perform, enzymes can be purchased with a constant quality and no surgically modified animals are needed. However, there are clear methodological differences between enzyme and rumen fluid based techniques. Enzymes have a limited lifetime with gradually decreasing activity during incubation. Rumen fluid consists of microbes, which are able to grow during the incubation, with highest activity just before exhaustion of the substrate. Enzymatic techniques are generally used as endpoint measurements, determining total digestibility. Determining rate of digestibility would need the determination of the residue after several incubation periods, making this technique too laborious.

The most widely used enzymatic technique to determine organic matter degradation is the so-called cellulase technique (De Boever *et al.*, 1988; Jones and Theodorou, 2000). Although the method is called the cellulase technique, most cellulase preparations are crude extracts of fungi or bacteria with a broad spectrum of cell wall degrading enzymes. In the early seventies Jarrige *et al.* (1970) and Jones and Hayward (1973) showed the potential of the cellulase technique to estimate in vivo digestibilities of grass, legumes and dried grasses ( $R^2 = 0.85$ ). Terry *et al.* (1978) correlated the pepsin-cellulase technique with the two-stage rumen fluid – pepsin technique (Tilley and Terry, 1963) and observed that the enzymatic technique was nearly as good as the rumen fluid based technique for predicting the digestibilities of 73 forage samples. One of the most applied ways to use the cellulase technique is 24 h incubation in an acid pepsin solution, 30 min heating at 80 °C followed by filtration and 24 h incubation in a cellulase containing buffer. After the incubations the organic matter residue is determined.

Cone *et al.* (1996a) developed an enzymatic technique for estimation of the amount of fermentable organic matter (FOM) in both forages and concentrate feed ingredients. They used a multi-enzyme complex of *Aspergillus sp.* containing a wide range of carbohydrases, including arabinase, cellulase,  $\beta$ -glucanase, hemicellulase and xylanase (Viscozyme, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark). The degradation rate of the organic matter was calculated from the residues after different incubation periods with enzymes. The calculated FOM, obtained with the enzymatic technique, was compared with the FOM determined with the nylon bag technique for 109 samples. FOM determined with the enzymatic method showed a moderate correlation ( $R^2 = 0.71$ ) with the nylon bag FOM. The relationship could be improved by separating the high crude fibre samples ( $R^2 = 0.88$ ) from the other samples ( $R^2 = 0.77$ ). Degradation rates with the enzymatic method were high compared to the assumed rumen passage rates. It proved that FOM could be predicted with a similar accuracy ( $R^2 = 0.76 - 0.80$ ) by the undegraded fraction after 24 h incubation with enzymes.

## IN TECHNIQUES BASED ON RUMEN FLUID

There are different rumen fluid based in vitro techniques describing the degradation of organic matter (Tilley and Terry, 1963), cell walls (Goering and Van Soest, 1970) and starch (Cone, 1991). With these methods, it is possible to determine the kinetics of degradation by analysing the incubation residues after different incubation periods, although this is very laborious and therefore seldomly done.

The most well known and most applied technique is the two-stage technique described by Tilley and Terry (1963). Samples are incubated for 24 h in buffered rumen fluid, followed by 24 h in an acid pepsin solution. At the end of the incubations the residual organic matter is determined. The method has widely been used to predict *in vivo* total tract digestibility, generally obtained with wether sheep fed at maintenance. Givens *et al.* (1989) showed that the two stage *in vitro* method accounted for 74.1 % of the variation in digestibility determined with wether sheep. To determine the real cell wall digestibility Goering and Van Soest (1970) developed a method with incubation in rumen fluid followed by a washing procedure with a neutral detergent solution, providing data of digestible NDF.

The gas production technique is nowadays generally used to determine rate of fermentation of feed samples in rumen fluid. The technique, however, was initially developed in the seventies to determine the extent of degradation, based on the assumption of a linear relationship between gas production and organic matter fermentation. Menke *et al.* (1979) described a simple system, incubating samples in buffered rumen fluid in large glass syringes. Fermentation gasses push the piston outward and the amount of produced gas can be recorded. The gas production after 24 h incubation in buffered rumen fluid, combined with the chemical composition, is used in Germany to estimate the *in vivo* digestibility and amount of metabolizable energy for ruminants (Menke and Steingass, 1988).

## THE GAS PRODUCTION TECHNIQUE

### ***Physiological background***

The principles of the gas production technique were described by Menke *et al.* (1979). Gas is released from a CO<sub>2</sub>-saturated bicarbonate/phosphate buffer (Steingass, 1983) upon the fermentation of substrate in buffered rumen fluid. CO<sub>2</sub> can be released directly from the buffer and indirectly as the consequence of H<sup>+</sup>-production from the volatile fatty acids (Beuvink and Spoelstra, 1992). As can be seen from Table I the amount of gas released depends on the fermentation pathway. Gas production of samples differing highly in pattern of VFA synthesis should be corrected for those differences. For samples not differing much in chemical composition, this correction proved not necessary. The production of methane does not contribute to the total amount of gas produced as for each molecule of methane produced, one molecule of CO<sub>2</sub> is consumed.

TABLE I - DIRECT AND INDIRECT GAS PRODUCTION FROM GLUCOSE FERMENTED TO DIFFERENT VOLATILE FATTY ACIDS.

<b>Direct gas production</b>	
Glucose + 2H <sub>2</sub> O	2 acetic + 2 CO <sub>2</sub> + 8 (H)
Glucose + 4 (H)	2 propionic acid + 2 H <sub>2</sub> O
Glucose	1 butyric acid + 2 CO <sub>2</sub> + 4 (H)
8 (H) + CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O
<b>Indirect gas production</b>	
H <sup>+</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ↔ (H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	↔ CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O

Gas production is not only influenced by the synthesis of VFA, but also by other fermentation end products influencing the pH. The fermentation of protein provides ammonia, which in the buffer binds with H<sup>+</sup> to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, inhibiting the indirect release of CO<sub>2</sub> molecules. Because 13 % of the used buffer is a phosphate buffer, 1 mole of ammonia will prevent the release of 0.87 mole CO<sub>2</sub>. The formula presented by Beuvink and Spoelstra (1992) can be adapted for the synthesis of ammonia to:

$$\text{ml gas} = V_m * \text{mmol (HAc} + 2 \text{ HB} + 0.87 \text{ Htot} - 0.87 \text{ NH}_3)$$

Where V<sub>m</sub> is the molar gas volume, which is 24.0 l/mole at 20 °C, HAc is acetic acid, HB is butyric acid and Htot is total volatile fatty acids.

### **Gas production equipment**

Since the principles of gas production upon fermentation in buffered rumen fluid were described by Menke *et al.* (1979), several attempts have been made to measure accurately the kinetics of gas production. Still many groups measure gas production using large glass syringes (Hidayat *et al.*, 1993; Khazaal and Ørskov, 1994; Nsahlai *et al.*, 1994), while others use manometric systems (Garg and Gupta, 1992; Waghorn and Stafford, 1993). The accuracy of both systems depends on the accuracy of reading the gas volume in the syringes and reading the manometers. Both systems require a periodic reading of the gas volume produced, which makes the measurements laborious and time consuming.

Since the early 90's different machines have been described to measure the kinetics of gas production, based on electronic pressure transducers (Pell and Schofield, 1993; Theodorou *et al.*, 1994; Cone *et al.*, 1996b; Mauricio *et al.*, 1999). The equipment described by Theodorou *et al.* (1994) and Mauricio *et al.* (1999)

uses pressure transducers but still needs the periodical reading of a digital display and the manual release of overpressure. The system described by Pell and Schofield (1993) combines each bottle with its own pressure transducer, making it easier to automate. In the latter system, no gas is released during the entire incubation up till 48 or 72 h. The system described by Cone *et al.* (1996b) also combines each bottle with its own pressure transducer, but in combination with electric micro-valves to release overpressure automatically.



Fig.1. Equipment developed by ID-Lelystad.

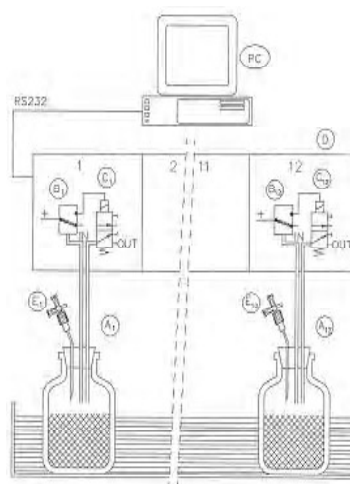


Fig. 2. Schematic presentation of the gas production equipment.

Fig. 1 shows a picture of the equipment developed by ID-Lelystad in cooperation with IMAG in Wageningen (Cone *et al.*, 1994; 1996b). Gas is accumulated in the bottles, but overpressure is released by micro-valves. The principles of the gas production equipment are shown in Fig. 2. Two butyl rubber tubes connect each bottle with a pressure transducer and a micro-valve. The pressure build up in a bottle is measured by an electronic pressure transducer (B) until the pressure in the bottle is equal to a pre-set upper value (c. 0.65 kPa). At that moment an electric gas valve (C) is opened, allowing the pressure to fall back to a pre-set lower value (c. 0.4 kPa) and the valve closes again. The time during which the valve is open is approximately 50 msec. Each valve opening represents a known amount of gas, set at about 0.6 ml. The amount of gas released depends on the head volume and the pre-set upper and lower limit, while the accuracy of the gas released is determined by the accuracy of the limits at which the valve opens and closes, which is highly accurate. The time at which each valve opening

occurs is stored in a data buffer representing the amount of gas produced during the incubation. In this way large numbers of data points (200-300) are obtained for each sample.

### ***Gas production incubations***

Routinely rumen fluid is obtained from two ruminally fistulated wether sheep or (dry) cows kept on a standard ration. Rumen fluid is taken 2 h after the morning feeding and collected in a warm insulated flask filled with CO<sub>2</sub>. The rumen fluid is filtered through cheese cloth and mixed (1:2 v/v) with an anaerobic buffer/mineral solution containing per litre 8.75 g NaHCO<sub>3</sub>, 1.00 g NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1.43 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.55 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 g MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.52 g Na<sub>2</sub>S, 0.017 g CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 0.015 g MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O, 0.002 g CoCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 0.012 g FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O and 0.125 g resazurin (after Menke *et al.*, 1979, as modified by Steingass, 1983). The residue on the muslin is discarded. All manipulations are done under a continuous flow of CO<sub>2</sub>.

Incubations are conducted in 250 ml serum bottles (Schott, Mainz, Germany) in which routinely 400 mg organic matter is incubated in 60 ml buffered rumen fluid. The bottles are placed in a shaking water bath with 50 movements per minute at 39 °C. Each sample is incubated at least in duplicate. In each series a blank (rumen fluid without sample) is run in duplicate. Between series the results are influenced by variations in rumen fluid from one day to the other, which makes the use of standards in each series necessary for routine feed evaluation. Combining rumen fluid from different animals can minimise differences in rumen fluid activity between different animals.

### ***Curve fit models***

Different attempts have been made to describe the release of gas from buffered rumen fluid by mathematical models (Krishnamoorthy *et al.*, 1991; Beuvink and Kogut, 1993; France *et al.*, 1993; Schofield *et al.*, 1994; Pitt *et al.*, 1999). Most of the used models to describe gas production data were developed to fit data obtained by rather simple equipment with a manual read out and a limited number of data, only facilitating the use of rather simple models. With the automated gas production equipment highly accurate gas production profiles are obtained with more than 250 data points over 48 h incubation. It proved that these profiles could not be described satisfactorily by simple models. Also more sophisticated models (Beuvink and Kogut, 1993; France *et al.*, 1993; Schofield *et al.*, 1994) were not able to describe the profiles accurately. Especially the initial gas production was

difficult to describe, as shown by Pell *et al.* (1993). For that reason a new empirical model was developed by research groups in Lelystad and in Wageningen (Groot *et al.*, 1996). This model is a multiphasic model, consisting of different subcurves describing the gas production of different components in the feedstuff (Groot *et al.*, 1996).

$$\text{ml gas} = A_1/(1+(B_1/t)^{C_1}) + \dots + A_n/(1+(B_n/t)^{C_n})$$

A = maximum gas production in ml/g OM, B = time (h) at which 50 % of the maximum gas production (A) is reached, C = parameter determining the shape of the curve, t = time in h, n = number of the subcurve. The advantage of the multiphasic model is that it is a very flexible model able to describe the obtained cumulative gas production profiles very accurately, also during the first hours of gas production which is not able with many other models (Pell *et al.*, 1993). All processes in any subcurve start at the beginning of the incubation, but have their highest contribution to the cumulative gas production at a different time of incubation. This contribution can even be (nearly) zero. This model makes the use of lag phases superfluous.

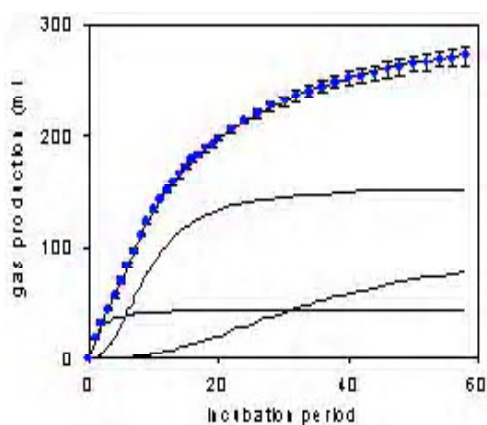


Fig. 3. Mean cumulative gas production profile of a maize stover sample ( $\lambda$ ).

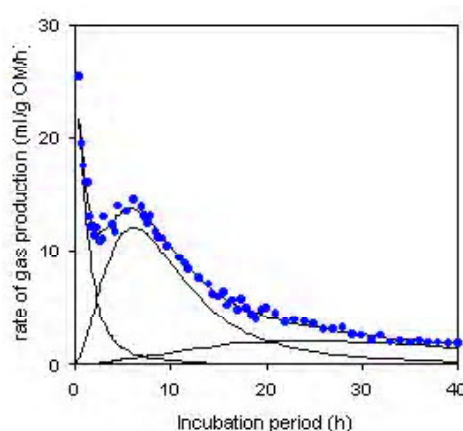


Fig. 4. Calculated first derivative of the cumulative gas production profile of a maize stover sample, as shown in Fig. 3, ( $\lambda$ ), calculated best fit (solid line through dots) and the calculated subcurves.

Fig. 3 shows an example of a cumulative gas production profile of a maize stover sample, fitted with the three-phasic model. The used model fitted exactly the determined data points of the gas production profile ( $R^2 = 0.999$ ). The first calculated subcurve (Fig. 3) started immediately after the start of the incubation,

representing the fermentation of the easy fermentable (soluble) part of the substrate. Gas production in subcurve 2 started after a few hours of incubation and reached its maximum after c. 12 h, representing the fermentation of the non-soluble part of the substrate. The gas production in subcurve 3 started after 15 to 20 h and continued after 40 h incubation. This subcurve is thought to be not related to fermentation of the substrate, but to turnover of the microbial mass (Cone *et al.*, 1997). Although much information can be drawn from cumulative gas production profiles, often much more details can be seen in the rate of gas production, i.e. the first derivative of the cumulative gas production profiles. The rate of gas production of the same maize stover sample, as shown in Figure 3, is shown in Fig. 4.

### ***What do subcurves represent?***

Cone *et al.* (1997) isolated the water-soluble fraction and the residue of different feed samples and incubated them in buffered rumen fluid for gas production analysis and compared the gas production profiles with the calculated subcurves after incubation of the total sample. The authors showed that there was a good relationship between  $A_1$  and the gas production of the soluble fraction ( $R^2 = 0.93$ ) and between  $A_2$  and the gas production of the non-soluble fraction after 20 h incubation ( $R^2 = 0.95$ ). Cone *et al.* (1997) showed that gas production continued after exhaustion of a glucose substrate and concluded that the gas production after exhaustion of the substrate was the result of turnover and fermentation of the microbial population. Gas production from microbial turnover complicates the interpretation of cumulative gas production profiles and is therefore often ignored.

### ***Sample preparation, fresh vs. dried and milled***

Samples are routinely dried and milled before analysis. However, roughages are eaten mainly fresh or ensiled by the animals. Experiments by Cone (1998) show that gas production profiles with a freeze-dried, milled grass silage sample and a fresh grass silage sample cut into small pieces (5 mm) were different. Initial gas production was highest for the fresh sample, whereas after 3-4 h the rate of gas production was highest for the dried sample. Indicating that part of the soluble cell content is not soluble anymore after drying. This gives a lower initial gas production and an increased gas production when the cell walls are fermented. It should be noted that the fresh silage was stored frozen and thawed before usage as is usually done for nylon bag experiments.



### ***Adaptation of microbial rumen population to ration***

To use the gas production technique routinely for feed evaluation it is essential that all analyses are performed with a standard protocol. The largest source of variation with this technique is the variation in rumen fluid activity. Rumen fluid can be obtained from sheep, lactating cows, dry cows, steers or other animals, each with its own amount of ration and ration composition. Rumen fluid can be sampled at different times before or after feeding, from different parts of the rumen and only the liquid part can be taken or a part of the solid mass can be added to it. Also straining the rumen fluid and dilution with buffer can be done in many different ways and will influence the rumen fluid activity.

Cone *et al.* (1996b) performed experiments to visualise the effects of rumen fluid activity on gas production profiles. Gas production profiles were recorded for grass and corn cob mix (CCM) with rumen fluid from a cow fed a concentrate/grass silage and a cow fed a maize/grass silage ration. It was shown that there were small differences in the shapes of the cumulative gas production profiles obtained with the two different sources of rumen fluid. CCM, high in starch, fermented more rapidly in rumen fluid from a concentrate fed cow than in rumen fluid from the maize-fed cow. However, after 40 h of incubation, total gas produced was not significantly ( $p < 0.05$ ) different. The initial rate of fermentation of grass was higher in rumen fluid from the concentrate-fed cow, but total gas production after 40 h was lower, than in rumen fluid from the maize-fed cow.

The influence of activity of rumen fluid on gas production profiles of CCM was also tested by changing the ration of two donor sheep from grazed grass to a standard ration consisting of 800 g hay and 200 g concentrate daily (Cone *et al.*, 1996b). It was shown that there was a very fast adaptation of the microbial population to the fermentation of the starchy CCM. After only 1 day of feeding concentrate to the sheep, the rate of fermentation of CCM was nearly the same as after 2 weeks (fully adapted to the standard ration).

### ***Protocol for gas production analysis***

In our laboratory we use a standard protocol for gas production analysis. Rumen fluid is taken from two wether sheep or two dry cows, kept on a standard ration consisting of hay and some concentrate. Rumen fluid from two animals, taken 2 h after the morning feeding, is mixed to minimise variation in rumen fluid activity from day to day. Only the liquid phase from the rumen fluid, strained through two layers of muslin, is used. The preparation of the buffered rumen fluid is as

described by Menke *et al.* (1979) and as modified by Steingass (1983). One litre of strained rumen fluid is diluted with 2 litres of phosphate/carbonate buffer (Cone *et al.*, 1996b). The advantage of high concentrated rumen fluid is that it comes close to the circumstances in the rumen itself and it prevents the occurrence of (artificial) lag periods. Other groups use more diluted buffered rumen fluid. Stefanon *et al.* (1996) use 4 volumes of buffer and 1 volume of strained rumen fluid while Williams *et al.* (1995) dilute 1 volume of strained rumen fluid with 16 volumes of buffer.

### ***Different sources of rumen fluid as inoculum***

A systematic study on the influence of rumen fluid from cows and sheep on gas production profiles of 21 (concentrate) feed samples was performed by Cone *et al.* (2002a). Both sheep and cows were fed a comparable standard ration. Figure 5 shows the gas production profiles of a grass sample obtained with buffered rumen fluid from sheep and cows. Although total gas production was somewhat lower with sheep rumen fluid, the profiles were comparable in its shape. The curves were fitted with a mono-phasic model (Groot *et al.*, 1996). Data were obtained for  $A_m$  (maximum asymptotic gas production in ml/g OM),  $B_m$  (time needed for 50 % of  $A_m$  in h) and  $C_m$  (a parameter determining the shape of the profile). For the 21 investigated samples (Cone *et al.*, 2002a) there was a strong linear relationship in total gas production after 48 h incubation in rumen fluid from cows and rumen fluid from sheep ( $R^2 = 0.96$ ). As the calculated maximum gas production ( $A_m$ ), obtained after fitting the profiles with a mono-phasic model (Groot *et al.*, 1996), was closely related to the determined total gas production, there was also a close relationship between  $A_m$  obtained with cow rumen fluid and sheep rumen fluid ( $R^2 = 0.90$ ). For the majority of the feedstuffs the value of  $B_m$  was higher in sheep rumen than in cow rumen fluid, indicating a decreased rate of fermentation in sheep rumen fluid compared to cow rumen fluid. The correlation of  $B_m$  for both sources of rumen fluid was not very good ( $R^2 = 0.62$ ). Surprisingly, the curve sharpness parameter  $C_m$  displayed a high correlation between the two rumen fluid sources ( $R^2 = 0.92$ ).

The results of Cone *et al.* (2002a) showed that gas production was consistently higher with rumen fluid from cows than from sheep. It cannot be stated that these differences were caused by the animal species itself. The activity of the rumen fluid is also determined by the ration of the animals, which was not exactly the same for the cows and sheep. However, for the 21 investigated feed samples, sheep rumen fluid could replace cow rumen fluid for the determination of gas

production at 24 h and 48 h,  $A_m$  and  $C_m$ . But cow rumen fluid could not be replaced by sheep rumen fluid for the determination of the rate of gas production ( $B_m$ ) ( $R^2 = 0.62$ ). In general it can be concluded that precautions should be taken, comparing the rate of fermentation, obtained with different sources of rumen fluid.

### **Fresh faeces as source of inoculum**

Many attempts have been described to use ruminant faeces as an alternative to rumen fluid in *in vitro* degradation studies. Cone *et al.* (2002a) compared the gas production profiles of the above mentioned 21 (concentrate) feed samples obtained with cows rumen fluid and faeces of the same cows as inoculum. Fig. 5 shows that both the rate and extent of gas production of grass with cow faeces as inoculum was lower than with cow rumen fluid. At 48 h incubation a good linear relationship between cow rumen fluid and cow faeces was obtained for gas production ( $R^2 = 0.88$ ). However, at 24 h incubation this relationship was much less pronounced ( $R^2 = 0.61$ ). Also the value for  $A_m$  was consistently lower for cow faeces than for cow rumen fluid ( $R^2 = 0.82$ ).

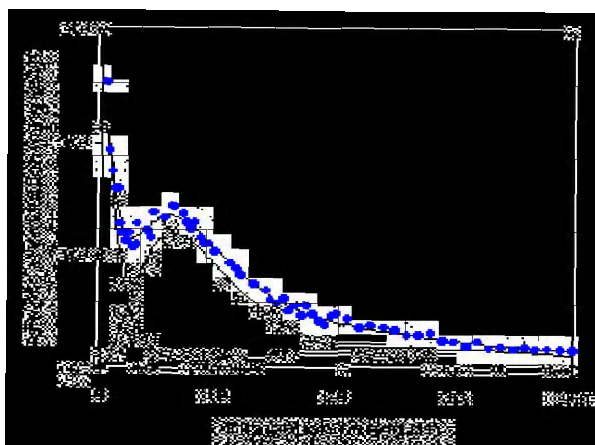


Fig. 5. Mean cumulative gas production profiles ( $n=2$ ) of a grass sample obtained with rumen fluid (325 in buffed) from cows.

The rate of fermentation was lower for the majority of the feedstuffs with cow faeces than with cow rumen fluid. There was a very poor relationship between the values of  $B_m$  obtained with faeces and rumen fluid as inoculum ( $R^2 = 0.24$ ). For  $C_m$  there was a moderate relationship between cow rumen fluid and cow faeces ( $R^2 = 0.61$ ). The results indicate that faeces can be used as an alternative for rumen

fluid to determine gas production after prolonged incubations, but not to determine the rate of fermentation. Different other studies indicate that the use of faeces as inoculum shows potentials as an alternative to rumen fluid in in vitro digestibility assays used as endpoint measurements (El Shaer *et al.*, 1987; Aiple, 1993; Omed *et al.*, 1989; Akhter *et al.*, 1999).

### ***Influence of protein fermentation on gas production profiles***

The stoichiometry in Table I describes the fermentation pathways for glucose. It can be assumed that the fermentation pathways of carbohydrates in general do not deviate much from that of glucose. However, many feedstuffs also contain high amounts of protein. The dry matter content of young grass, fertilised with high amounts of nitrogen, can contain up to 25% of protein. The biochemical pathway of protein fermentation is different from that of carbohydrates. Fermentation of protein gives more branched volatile fatty acids and ammonia. Ammonia in the buffer binds  $H^+$  to form  $NH_4^+$ . Each  $H^+$  ion that is bound by ammonia shifts the equilibrium in the buffer towards  $HCO_3^-$ , preventing the release of one molecule  $CO_2$  from the buffer.

Already in the early 80's Steingass (1983) pointed on the different gas production of protein fermentation compared to carbohydrate fermentation. Although gas production data of feedstuffs differing largely in protein content may lead to misinterpretation of the results, this problem is widely ignored. Cone and Van Gelder (1999) showed that the ranking of gas production profiles of grass samples, differing in growing days and so in protein content, did not coincide with the maturation of the samples and was not in accordance with nylon bag and Tilley and Terry (1963) data. The ranking of the rate of gas production during the first 4 h was highly influenced by fermentation of the soluble fraction, including soluble protein. The ranking of gas production rate from 4 to 10 h, gas production caused by fermentation of the non-soluble cell wall fraction, matched exactly with the growing days of the grass samples. As sugars and protein are water-soluble these components will be fermented during the initial hours of incubation in rumen fluid. The altered gas production of protein fermentation was responsible for the different ranking in gas production during the first 4 h of incubation.

Cone and Van Gelder (1999) investigated the influence of protein fermentation by incubation of different pure carbohydrate samples and casein and mixtures of it. These authors concluded that fermentation of protein produces only 32 % gas compared to carbohydrates. It was calculated that each percentage of

protein in a sample caused a reduction in gas production by 2.48 ml/g OM, compared to a sample of pure carbohydrates. For a meaningful comparison of the gas production profiles of feed samples differing highly in protein content, Cone and Van Gelder (1999) recommended to correct the final gas production for protein fermentation, to plot the rate of gas production to visualise the different subcurves in gas production, to calculate the first and second subcurve (Groot *et al.*, 1996) and, if necessary, to correct the first subcurve.

### ***Relationship between gas production and Tilley and Terry techniques.***

The relationship between the Tilley and Terry technique (T&T, Tilley and Terry, 1963) and the gas production technique was studied by Cone *et al.* (1998) for a limited number of grass and grass silage samples, differing in maturity. For these 15 samples, highest correlation was observed between T&T and  $B_2$  ( $R^2 = 0.94$ ). Surprisingly highest correlation was not observed between T&T and  $A_2$  ( $R^2 = 0.04$ ). Obviously the rate of fermentation of the soluble fraction ( $B_2$ ) was closer related to the degradation of organic matter determined with the T&T technique, than the gas production. Cone *et al.* (1999) repeated this research with the same 15 samples with other sources of rumen fluid and observed comparable results.

### ***Relationship between gas production and nylon bag techniques***

Although there are methodological differences, both the nylon bag technique (Ørskov and McDonald, 1979) and the gas production technique (Menke *et al.*, 1979; Cone *et al.*, 1996b) give information on rate of degradation. With the in situ technique the solid residue in the nylon bags after an incubation period is determined, whereas with the gas production technique the gas production as a result of fermentation of the total sample, including the soluble part, in buffered rumen fluid is determined.

Both the in situ degradation rate (kd) and the time at which half of the gas production of the non-soluble fraction is reached ( $B_2$ ) represent a measure of the degradation kinetics in rumen fluid. The rate of degradation in nylon bags is usually described with an exponential model (Robinson *et al.*, 1986), whereas gas production profiles are described by a sigmoidal model (Groot *et al.*, 1996). Cone *et al.* (1998) transformed the calculated value of  $B_2$  to the nylon bag parameter kd (degradation rate of the non-soluble fraction in %/h), by fitting the calculated second subcurve of the gas production profiles with the exponential model of Robinson *et al.* (1986).

Also mathematically  $B_2$  can be transformed into  $k_d$  by:  $k_d = ((\ln 2/k_d) * 100)$  (Cone *et al.*, 2002b).

Several authors observed good relationships for degradation characteristics in grass (Cone *et al.*, 1998), grass silage (Cone *et al.*, 1999) and hay (Lopez *et al.*, 1999) determined in situ and with the gas production technique. Cone *et al.* (1998) investigated the OM and NDF degradability with the nylon bag technique and the gas production technique for 10 grass samples, differing in maturity and N fertilisation. Both techniques showed an increased rate of degradation of the high fertilised samples compared to the low ones. Also with both techniques the rate of degradation of grass cut in late summer was higher than that of grass cut in late spring or early summer. A good linear relationship was observed between the calculated  $k_d$  ( $k_d$ -vitro) of the non-soluble fraction, obtained with the gas production technique, and the  $k_d$  of OM ( $R^2 = 0.87$ ) and NDF ( $R^2 = 0.83$ ), obtained with the nylon bag technique. Also good relationships were observed by direct correlation of the in situ determined  $k_d$  and gas production parameters. The  $R^2$  between the  $k_d$  of OM ( $k_d$ -OM) and  $B_2$  was 0.74 and between the  $k_d$  of NDF ( $k_d$ -NDF) and  $B_2$  0.68. Both relationships could be improved considerably by taking account of the gas production after 72 h ( $R^2 = 0.87 - 0.89$ ). The relationship between  $k_d$ -NDF and gas production data could even be improved by taking account of the gas production after 24 h ( $R^2 = 0.97$ ) whereas the relationship between  $k_d$ -OM and gas production data could slightly be improved by taking account of the CP-fraction ( $R^2 = 0.91$ ). Also the amount of fermentable organic matter (FOM) could be estimated accurately ( $R^2 = 0.93 - 0.96$ ) from gas production parameters (Cone *et al.*, 1998).

Recently Cone *et al.* (2002b) compared fermentation characteristics obtained with the gas production technique with degradation characteristics obtained with the nylon bag technique for 21 concentrate feed ingredients. The results showed only a poor to moderate estimation of in situ degradation data of OM by gas production parameters. Also chemical composition combined with gas production data did not adequately estimate in situ degradation data for OM in these feedstuffs. During in situ incubations starch can disappear from the nylon bags without being degraded (Huntington and Givens, 1995). Therefore, washed out particles of starch are not included in the D-fraction in the in situ technique, whereas in the gas production technique they are included. These methodological differences are less evident for grass that contains no starch and generally more NDF with little or no washout fraction.

It can be concluded that the gas production technique can be used as an alternative for the nylon bag technique for the determination of degradation characteristics of organic matter and NDF (cell walls). However, the gas production technique and the nylon bag technique do not provide comparable results for starchy feedstuffs.

### ***Relationship gas production and in vivo data***

As real *in vivo* data are scarce, hardly any information is available on the relationship between gas production and *in vivo* data. Cone *et al.* (1999) compared different techniques to study the rumen fermentation characteristics of maturing grass and grass silage, two of them were also analysed in an *in vivo* trial. The *in vivo* results and gas production data showed the same tendency, the young grass sample being faster degraded than the old one. Due to the limited number of samples (2) no conclusions can be drawn from it. Future research should be focused on comparison of the gas production technique with *in vivo* data and on the use of the gas production technique in routine ruminant feed evaluation.

## **REFERENCES**

- AIPLE, K.P., 1993. Vergleichende Untersuchungen mit Pansensaft und Kot als Inokulum im Hohenheimer Futterwerttest. Thesis, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- AHKTER, S., OWEN, E., THEODOROU, M.K., BUTLER, E.A. and MINSON, D.J., 1999. Bovine faeces as a source of micro-organisms for the *in vitro* digestibility assay of forages. *Grass and Forage Science*, 54: 219-226.
- BEUVINK, J.M.W. and KOGUT, J., 1993. Modelling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *J. Animal Science*, 71: 1041-1046.
- CONE, J.W., 1991. Degradation of starch in feed concentrates by enzymes, rumen fluid and rumen enzymes. *J. Science of Food and Agriculture*, 54: 23-34.
- CONE, J.W., 1998. The development, use and application of the gas production technique at the DLO Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad, the Netherlands. Occasional Publication British Society of Animal Science, 22: 65-78.
- CONE, J.W. and VAN GELDER, A.H., 1999. Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology*, 76: 251-264.
- CONE, J.W., BEUVINK, J.M.W. and RODRIGUES, M., 1994. Use and applications of an automated time related gas production test for the *in vitro* study of fermentation kinetics in the rumen. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 1: 25-37.

- CONE, J.W., VAN GELDER, A.H. and VAN VUUREN, A.M., 1996a. *In vitro* estimation of rumen fermentable organic matter using enzymes. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 44: 103-110.
- CONE, J.W., VAN GELDER, A.H., VISSCHER, G.J.W. and OUDSHOORN, L., 1996b. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology*, 61: 113-128.
- CONE, J.W., VAN GELDER, A.H. and DRIEHUIS, F., 1997. Description of gas production profiles with a three phasic model. *Animal Feed Science and Technology*, 66: 31-45.
- CONE, J.W., VAN GELDER, A.H. and VALK, H., 1998. Prediction of nylon bag degradation characteristics of grass samples with the gas production technique. *J. Science of Food and Agriculture*, 77: 421-426.
- CONE, J.W., VAN GELDER, A.H., SOLIMAN, I.A., DE VISSER, H. and VAN VUUREN, A.M., 1999. Different techniques to study rumen fermentation characteristics of maturing grass and grass silage. *J. Dairy Science*, 82: 957-966.
- CONE, J.W., VAN GELDER, A.H. and BACHMANN, H., 2002a. Influence of inoculum source on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology*, 99: 221-231.
- CONE, J.W., VAN GELDER, A.H., BACHMANN, H. and HINDLE, V.A., 2002b. Comparison of organic matter degradation in several feedsuffs in the rumen as determined with the nylon bag and gas production techniques. *Animal Feed Science and Technology*, 96: 55-67.
- DE BOEVER, J.L., COTTYN, B.G., BUYSSE, F.X. and VANACKER, J.M., 1988. The use of a cellulase technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of forages. *Animal Feed Science and Technology*, 19: 247-260.
- EL SHAER, H.M., OMED, H.M. and CHAMBERLAIN, A.G., 1987. Use of faecal organisms from sheep for the determination of digestibility. *J. Agricultural Science, Cambridge*, 109: 257-259.
- FRANCE, J., DHANOA, M.S., THEODOROU, M.K., LISTER, S.J., DAVIES, S.J. and ISAC, D., 1993. A model to interpret gas accumulation profiles with *in vitro* degradation of ruminant feeds. *J. Theoretical Biology*, 163: 99-111.
- GARG, M.R. and GUPTA, B.N., 1992. Effect of different supplements on the degradability of organic matter, cell wall constituents, *in vitro* gas production and organic matter digestibility of wheat straw. *Animal Feed Science and Technology*, 38: 187-198.
- GIVENS, D.I., EVERINGTON, J.M. and ADANSON, A.H., 1989. The digestibility and metabolisable energy content of grass silage and their prediction from laboratory measurements. *Animal Feed Science and Technology*, 24: 27-43.
- GOERING, H.K., VAN SOEST, P.J., 1970. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agricultural Handbook No. 379*, Agriculture Research Service, Washington, DC.
- GROOT, J.C.J., CONE, J.W., WILLIAMS, B.A., DEBERSAQUE, F. and LANTINGA, E.A., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics on *in vitro* ruminal fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 64: 77-89.



- HIDAYAT, HILLMAN, K., NEWBOLD, C.J. and STEWART, C.S., 1993. The contributions of bacteria and protozoa to ruminal forage fermentation *in vitro*, as determined by microbial gas production. *Animal Feed Science and Technology*, 42: 193-208.
- HUNTINGTON, J.A. and GIVENS, D.I., 1995. The in situ technique for studying rumen degradation of feeds. A review of the procedure. *Nutrition Abstracts and Reviews*, 65: 63-93.
- JARRIGE, R., THIVEND, P. and DEMARQUILLY, C., 1970. Development of cellulolytic enzyme digestion for predicting the nutritive value of forages. In: *Proceedings of the XI<sup>th</sup> International Grassland Congress*. Surfers Paradise, Australia, pp. 762-766.
- JONES, D.I.H. and HAYWARD, M.V., 1973. A cellulase digestion technique for predicting dry matter digestibility of grasses. *J. Science of Food and Agriculture*, 24: 1419-1426.
- JONES, D.I.H. and THEODOROU, M.K., 2000. Enzyme techniques for estimating digestibility. In: D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford, M.H. Omed (eds.), *Forage Evaluation in Ruminants*. CAB international, Wallingford, New York. pp 155-173.
- KHAZAAL, K. and ØRSKOV, E.R., 1994. The *in vitro* gas production technique: an investigation on its potential use with insoluble polyvinylpyrrolidone for the assessment of phenolics-related antinutritive factors in browse species. *Animal Feed Science and Technology*, 47: 305-320.
- KRISNAMOORTHY, U., SOLLER, H., STEINGASS, H. and MENKE K.H., 1991. A comparative study on rumen fermentation of energy supplements *in vitro*. *J. Animal Physiology and Animal Nutrition*, 65: 28-35.
- LOPEZ, S., CARRO, M.D., GONZALES, J.S. and OVEJERO, F.J., 1999. Comparison of different in vitro and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 73: 99-113.
- MAURICIO, R.M., MOULD, F.L., DHANOA, M.S., OWEN, E.R., CHANNA, K.S. and THEODOROU, M.K., 1999. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, 79: 321-330.
- MEHREZ, A.Z. and ØRSKOV, E.R., 1977. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agricultural Science, Cambridge*, 88: 645-650.
- MENKE, K.H., RAAB, L., SALEWSKI, A., STEINGASS, H., FRITZ, D. and SCHNEIDER, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agricultural Science, Cambridge*, 93: 217-222.
- MENKE, K.H. and STEINGASS, H., 1988. Estimation of the energy feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28, 7-55.
- NSAHLAI, I.V., SIAW, D.E.K.A. and OSUJI, P.O., 1994. The relationship between gas production and chemical composition of 23 browes of the genus *Sesbania*. *J. Science of Food and Agriculture*, 65: 13-20.

- OMED, H.M., AXFORD, R.F.E., CHAMBERLAIN, A.G. and GIVENS, D.I., 1989. A comparison of three laboratory techniques for the estimation of the digestibility of feedstuffs for ruminants. *J. Agricultural Science, Cambridge*, 113: 35-39.
- ØRSKOV, E.R. and McDONALD, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agricultural Science, Cambridge*, 92: 499-503.
- ØRSKOV, E.R., 2000. The in situ technique for the estimation of forage degradability in ruminants. In: D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford, M.H. Omed (eds.). *Forage Evaluation in Ruminants*. CAB international, Wallingford, New York, pp. 175-188.
- PELL, A.N. and SCHOFIELD, P., 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Science*, 76: 1063-1073.
- PELL, A.N., SCHOFIELD, P. and STONE, W.C., 1993. Rates of digestion of feeds measured *in vitro* with computers. In: *Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, October 19-21, Rochester, NY, pp. 74-81.
- PITT, R.E., CROSS, T.L., PELL, A.N., SCHOFIELD, P. and DOANE, P.H., 1999. Use of *in vitro* gas production models in ruminal kinetics. *Mathematical biosciences*, 159: 145-163.
- ROBINSON, P.H., FADEL, J.G. and TAMMINGA, S., 1986. Evaluation of mathematical models to describe neutral detergent residue in terms of its susceptibility to degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 15: 249-271.
- SCHOFIELD, P., PITT, R.E. and PELL, A.N., 1994. Kinetics of fiber degradation from *in vitro* gas production. *J. Animal Science*, 72: 2980-2991.
- STEINGASS, H., 1983. Bestimmung des energetischen Futterwertes von wirtschaftseigenen Futtermitteln aus der Gasbildung bei der Pansenfermentation *in vitro*. PhD Thesis, University of Hohenheim, Germany.
- STEFANON, B., PELL, A.N. and SCHOFIELD, P., 1996. Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and water-insoluble fractions of alfalfa and brome hay. *J. Animal Science*, 74: 1104-1115.
- TERRY, R.A., MUNDELL, D.C. and OSBOURN, D., 1978. Comparison of two *in vitro* procedures using rumen liquor-pepsin or pepsin-cellulase for prediction of forage digestibility. *J. British Grassland Society*, 33: 13-18.
- THEODOROU, M.K., WILLIAMS, B.A., DHANOA, M.S., McALLAN, A.B. and FRANCE, J., 1994. A new gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48: 185-197.
- TILLEY, J.M.A. and TERRY, R.A., 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. British Grassland Society*, 18: 104-111.
- VANHATALOO, A., 1995. Assessment of intestinal feed nitrogen digestibility in ruminants by the mobile-bag method. Dissertation, Agricultural Research Centre of Finland.

- WAGHORN, G.C. and STAFFORD, K.J., 1993. Gas production and nitrogen digestion by rumen microbes from deer and sheep. *New Zealand J. Agricultural Research*, 36: 493-497.
- WILLIAMS, B.A., VAN DER POEL, A.F.B., BOER, H. and TAMMINGA, S., 1995. The use of cumulative gas production to determine the effect of steam explosion on the fermentability of two substrates with different cell wall quality. *J. Science of Food and Agriculture*, 69: 33-39.