

## ÍNDICE

---

**Determinação de Ocratoxina A em alimentos compostos para animais (suínos e aves) por cromatografia líquida de alta resolução. Avaliação indirecta do método**

1

*H.M. Martins, S. A. Magalhães e M.M. Guerra*

---

**O metabolismo de biotransformação em peixes: Uma revisão ambiental**

11

*A. Fontáinhas-Fernandes, F. Peixoto e D. Santos*

---

**Influência do melhoramento de pastagens no comportamento dos animais em pastoreio no montado**

29

*H. Babo, J. Lopes, D. Navas e J. Potes*

---

**Potencial de utilização do arrefecimento evaporativo na bovinocultura leiteira durante períodos de stress térmico no Alentejo**

39

*M. Perissinotto, V. Fitas da Cruz, E. Lucas e D. J. de Moura*

---



## **DETERMINATION OF OCHRATOXIN A IN FEED (SWINE AND POULTRY) BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. INDIRECT EVALUATION OF THE METHOD**

**H. MARINA MARTINS<sup>1\*</sup>, SALOMÉ A. MAGALHÃES<sup>1</sup> e M. MANUELA GUERRA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratório Nacional de Investigação Veterinária - Serviço de Micologia, Estrada de Benfica 701, 1549-011 Lisboa;* <sup>2</sup> *CIISA- Faculdade de Medicina Veterinária - Pólo Universitário da Ajuda – Rua Professor Cid dos Santos, 1300-147 Lisboa; \*Correspondência: H. Marina Martins Laboratório Nacional de Investigação Veterinária - Serviço de Micologia, Estrada de Benfica 701, 1549-011 Lisboa; e-mail: marina.martins@lniv.min-agricultura.pt; magalhaes\_s@sapo.pt*

*(Recepção: 13 de Março de 2006; Aprovação: 18 de Junho de 2006)*

### **ABSTRACT**

Ochratoxin A (OTA) producing fungi are widely distributed in nature and have been detected in soils, plants, cereals, insects, seeds and also in animal products as a result of either feeding with mixed feeds contaminated with mycotoxins or contamination by toxigenic fungi. The production of OTA is influenced by several factors such as temperature (24 °C) and moisture (19-22%). A survey of OTA was carried out in feed for swine (50) and poultry (50) (N=100); the study was undertaken to obtain information concerning the natural occurrence of OTA in mixed feeds in Portugal. Samples were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC), with a detection limit of 2 µg/Kg. The recovery study was done using this levels of spiking 20, 15, 10, 5 and 2 ng/ml. The results show that the recovery was within the acceptable limits (70 to 110%). Out of the 50 samples of swine feed, one was positive (2%) with a level of 4.1µg/Kg. None of the 50 samples for poultry was contaminated. Results found in this study are significantly lower than those obtained by other authors, although concerning to tropical regions. In the near future efforts will be addressed for the detection of OTA in feedstuffs of tropical origins.

**Key words:** feed, HPLC, Ochratoxin A, poultry, swine

## **DETERMINAÇÃO DE OCHRATOXINA A EM ALIMENTOS COMPOSTOS PARA ANIMAIS (SUÍNOS E AVES) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO. AVALIAÇÃO INDIRECTA DO MÉTODO**

### **RESUMO**

Os fungos que produzem Ocratoxinas (OTA) são de distribuição cosmopolita sendo comuns nos solos, plantas em decomposição, insectos, sementes armazenadas, cereais e

também em alimentos compostos contaminados para animais. A produção de OTA é influenciada por diversos factores ecológicos de entre os quais se destacam a temperatura (24°C) e a humidade (19-22%). Efectuou-se um rastreio em alimentos compostos para suínos (50) e aves (50) (N=100), com vista à determinação da frequência com que esta micotoxina ocorre. Sob esse pretexto desenvolveu-se um procedimento analítico por Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), avaliando a respectiva recuperação, usando contaminações de OTA de 20, 15, 10, 5 e 2 ng/ml. Os resultados mostram que a taxa de recuperação se encontrava dentro dos limites aceitáveis (70 a 110%). O método cromatográfico revelou um limite de detecção de 2 µg/Kg. Das 50 amostras analisadas para suínos, verificou-se que apenas uma amostra (2%) apresentou resultados positivos cujo teor foi de 4,1 µg/Kg. Nenhuma das 50 amostras para aves revelou contaminação. Os resultados encontrados são significativamente inferiores aos registados por diversos autores que estudaram o assunto em regiões tropicais, pelo que se justifica continuar esta linha de pesquisa, orientada contudo para matérias primas de origem tropical.

**Palavras-chave:** alimentos compostos, aves, HPLC, Ocratoxina A, suínos

## INTRODUÇÃO

As ocratoxinas são produzidas por várias estirpes de *Aspergillus ochraceus*. Posteriormente, verificou-se que também é produzida por *A. ostianus*, *A. melleus*, *A. petrarkii*, *A. sclerotium*, *A. sulphureus*, *Penicillium commune*, *P. cyclopium*, *P. palitans*, *P. purpurescens*, *P. variable* e *P. viridicatum* (Betina, 1989). Os produtores mais importantes de ocratoxinas são *P. viridicatum* e *A. ochraceus*, mas nem todas as estirpes destes fungos são toxigenicas. Foram identificadas 9 ocratoxinas, mas apenas os compostos designados por A e B são produzidos em condições naturais (Krogh, 1987).

Quimicamente, as ocratoxinas são derivados  $\alpha$  e  $\beta$  da fenilalanina unida por uma ligação amina a uma 3,4-dihidroisocumarina, sendo a ocratoxina A a mais conhecida e importante (Cole e Cox, 1981). Desde 1965 que vêm sendo assinalados casos de intoxicações, doenças animais e humanas desencadeadas pela ocratoxina A como, por exemplo, a nefropatia dos Balcãs nos humanos e a nefropatia nos suínos (Austwick, 1975).

A ocratoxina A (OTA) actua como inibidor da tRNA sintetase proteica em vários microrganismos. Quando em determinadas concentrações, provoca efeitos inibitórios na migração dos macrófagos (47-50%), no entanto, este efeito pode ser evitado pela adição de fenilalanina. Outro dos efeitos provocado pela OTA é a diminuição da concentração de glicogénio, provocada pela inibição do transporte activo da glucose no fígado, pela supressão da síntese de glicogénio a partir da glucose e pela aceleração da decomposição de glicogénio. Este efeito tem sido atribuído ao decréscimo da glicogénese devido à inibição pela OTA de um enzima chave do sistema, o glicogénio sintetase (Miller e Trenholm, 1994). Nas aves, o

glicogénio acumula-se no fígado porque não está metabolicamente disponível devido à aparente inibição do processo de mobilização mediado pelo glucagon, enquanto que o glicogénio mobilizado no músculo pela epinefrina, se encontra disponível. As espécies monogástricas são muito mais sensíveis às ocratoxinas do que os ruminantes, assim a como outras micotoxinas. Atrasos no crescimento acompanhado da redução de apetência pelos alimentos sólidos e líquidos em animais jovens são o primeiro efeito de intoxicação (Bernardo, 2004).

Os efeitos adversos destas micotoxinas também são detectáveis em frangos a partir de concentrações superiores a 0,5 mg/Kg. Em suínos, observam-se alterações a partir de 0,2 mg/Kg (sinais de depressão, redução de ganho de peso, nefrite, enterite) (Carton e Krogh, 1979.)

Comparada com outras espécies animais, os suínos eliminam os resíduos de OTA muito lentamente; por exemplo, a excreção da OTA é cerca de 90 h nos porcos comparada com as 4 h nos frangos. A taxa de eliminação é ainda menor nos rins e fígado sendo de 100 a 110 h (Galtier et al., 1981; Cheeke, 1985).

Nos suínos, a nefropatia é o síndrome primário que ocorre após exposições prolongadas a doses de 0,2–4 mg OTA por Kg de ração (Carton e Krogh, 1979). Os efeitos adversos nos rins são comparáveis aos registados noutras espécies (ratos, aves, peixes e macacos). Estas alterações são similares às detectadas no síndrome de nefropatia dos Balcãs que ocorreram em humanos e suínos (Betina, 1989).

O objectivo deste estudo foi determinar a frequência com que esta micotoxina ocorre em Portugal a pretexto do desenvolvimento de uma técnica analítica para pesquisa e doseamento de OTA em alimentos compostos para animais (suínos e aves) e respectiva avaliação indirecta.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostragem**

Para o estudo de ocorrência natural de OTA, utilizaram-se 100 amostras de alimentos compostos, sendo 50 destinadas a suínos de crescimento e acabamento e 50 a galinhas poedeiras. As amostras utilizadas nesta pesquisa eram provenientes de várias explorações de diferentes pontos do país. As amostras foram colhidas assepticamente, acondicionadas em

sacos plásticos e enviadas ao laboratório, à temperatura ambiente, por particulares e por técnicos oficiais responsáveis por colheitas de amostras, para controlo higio-sanitário.

### **Pesquisa e quantificação de Ocratoxina A por HPLC**

O método adoptado para pesquisa de OTA por cromatografia líquida de alta resolução, foi descrito por Entwisle *et al.* (1999; 2000), sendo o limite de quantificação de 0,002 mg.kg<sup>-1</sup> (2 ppm).

Relativamente às análises de recuperação, estas foram feitas utilizando os seguintes níveis de contaminação (20,15, 10, 5 e 2ng/ml).

Resumidamente a técnica consiste numa extracção 25g de amostra com uma mistura de acetoneitrilo:água (60:40), sendo o extracto sujeito à filtração. Purifica-se uma alíquota através de uma coluna de imunoafinidade (VICAM-Ochrates). Para a separação final e quantificação recorre-se a uma coluna de HPLC (V.W.R., Darmstadt, Alemanha) de fase reversa, (LiChrocart 250-4; Lichrospher 100/RP 18 5 µm; Detector de fluorescência, excitação: 360 nm; emissão: 420 nm).

Foram utilizados padrões de ocratoxina–Sigma, ref. O-1877, Espanha.

### **Avaliação indirecta do método e estudo recuperativo**

Após a obtenção dos resultados práticos através do método de HPLC, a avaliação indirecta foi efectuada por determinação dos seguintes parâmetros: curva de calibração; linearidade; limiares analíticos do método de ensaio e aplicabilidade.

Pretendeu-se com a representação destas rectas relacionar a resposta do sistema de medida com a concentração de amostra conhecida.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Avaliação indirecta do método e estudo recuperativo**

Por observação das Figs. 1 e 2, verifica-se que as curvas de calibração estão representadas por polinómios do primeiro grau, rectas, o que nos permite afirmar, pelo método dos mínimos quadrados, que existe uma distribuição normal dos erros ao longo da recta bem como uma homogeneidade de variância.

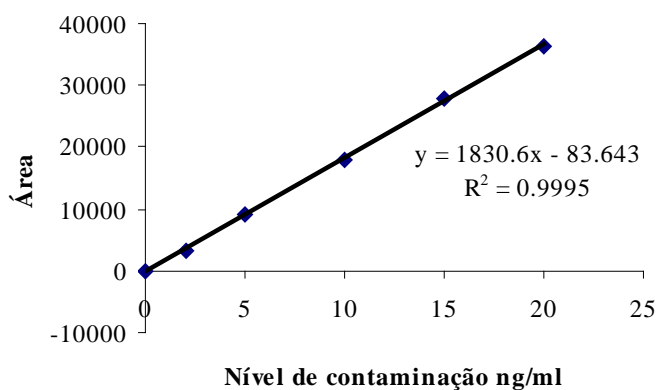


Figura 1 - Recta de calibração (Área).

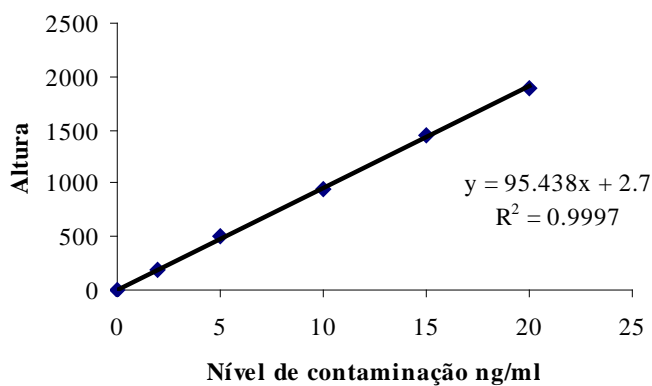


Figura 2 - Recta de calibração (Altura).

É de extrema importância compreender que quanto mais próximo de um estiver o coeficiente de correlação ( $r$ ), menor será o valor de desvio padrão residual e consequentemente, menor será a incerteza associada ao resultado final do ensaio (Quadro I).

A leitura dos teores de Ocratoxina A presentes nas amostras teste (contaminadas), assim como a percentagem de recuperação apresentam-se registadas nas Figs. 3 e 4. Como fica patente na Fig. 3, o aumento do nível de contaminação das amostras traduziu-se num aumento percentual do teor de Ocratoxina A recuperado.

QUADRO I - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE OTA EM ALIMENTOS COMPOSTOS.

[ ]*factor (µg/Kg)	X	b	σ	"z-score"	Incertezas
1,26	0,5	0,22	0,11	6,91	0,22
2,52	1,0	0,22	0,22	6,91	0,44
2,55	2,0	0,22	0,44	1,25	0,88
2,39	2,5	0,22	0,55	-0,20	1,10
3,80	4,0	0,22	0,88	-0,23	1,76
8,85	10	0,22	2,2	-0,52	4,40
11,54	20	0,22	4,4	-1,92	8,80
3,85	50	0,22	11,0	-1,47	22,0

X- valor predicto, após ajuste ; b- Parâmetro da equação de Horwitz; σ - Desvio padrão esperado ; "z-score"- parâmetro de eficácia do método.

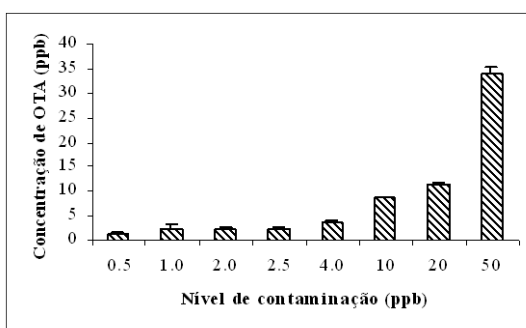


Figura 3 - Variação da concentração de OTA com o nível de contaminação (ppb).

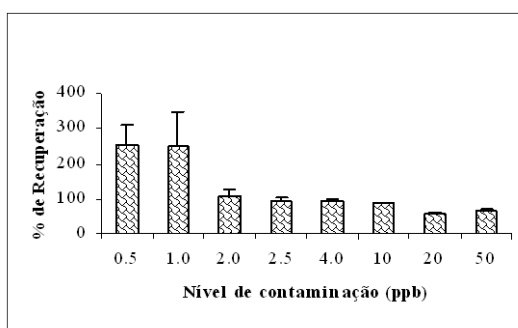


Figura 4 - Variação da percentagem de recuperação com o nível de contaminação (ppb).



Atendendo ao significado matemático de recuperação, determinação da quantidade de analito presente ou adicionado às amostras teste, pode inferir-se que as recuperações obtidas para os níveis de contaminação (2,0; 2,5; 4,0; e 10 ppb) demonstraram uma grande eficiência do método proposto. Isto porque, por vezes os analitos podem encontrar-se sob variadas formas nas amostras originando recuperações bastante acima dos limites estabelecidos como é o caso para as obtidas referentes aos níveis de contaminação (0,5; 1,0; 20; 50 ppb).

Em termos de taxa de recuperação, os resultados mostram que para os níveis de contaminação (2,0; 2,5; 4,0; e 10 ppb), esta se encontra dentro dos limites aceitáveis, conforme os estabelecidos no Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L201/100 de 17 de Julho de 1998, traduzindo-se na aplicabilidade do método.

Após interpretação dos resultados e em condições de repetibilidade, é possível afirmar que a percentagem de recuperação variou entre 88 e 108% no intervalo de contaminação de 2.0 e 10.0 ppb. O mesmo intervalo serviu de base ao estudo do limite de detecção. Este limite foi definido como a quantidade mais pequena de OTA que é reproduzível e detectada com precisão. O limite de detecção verificado corresponde ao valor de 2.0 ppb.

Procedeu-se ao cálculo da precisão, para que fosse possível uma avaliação qualitativa do método (Quadro II).

QUADRO II - DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO DO MÉTODO.

Contaminação (ppb)	Média	$\sigma$	% CVr	% Precisão
2,0	108,35	18,76	17,31	82,69
2,5	95,58	9,61	10,06	89,94
4,0	94,92	1,82	1,91	98,09
10	88,49	0,28	0,31	99,68

$\sigma$ - Desvio padrão ; CVr- Coeficiente de variação de repetibilidade

Este método, mostrou resultados óptimos para os valores analisados. O grau de concordância desses valores, correspondentes ao intervalo 2.0-10.0 ppb, é  $\geq 83\%$ . Com o intuito de reforçar a avaliação qualitativa do método, procedeu-se ainda ao cálculo dos “z-scores” (Quadro I). A estatística z permite concluir a distância de cada dado individual à média em unidades de desvio padrão. A avaliação dos “z-scores” foi efectuada tendo em conta os seguintes critérios:  $|z| \leq 2$  Satisfatório;  $2 < |z| < 3$  Questionável;  $|z| \geq 3$  Insatisfatório. Atendendo aos resultados apresentados no Quadro I e considerando o mesmo intervalo de contaminação usado no cálculo da precisão, pode-se concluir com 95% de confiança que todos os resultados

foram satisfatórios ( $|z| \leq 2$ ), traduzindo-se na adequada funcionalidade do método (Horwitz *et al.*, 1980).

### Ocorrência natural de OTA

O rastreio de Ocratoxinas em alimentos compostos para suínos, revelou que 2% das amostras estavam contaminadas (Quadro III) com teores de 4µg/Kg relativamente às rações para aves, nenhuma das amostras continha OTA. Em Portugal, não há registos de ocorrência de OTA em rações.

QUADRO III - FREQUÊNCIA E TEORES DE OTA EM ALIMENTOS COMPOSTOS PARA SUÍNOS E AVES.

	Frequência de OTA			Teores de OTA (µg/Kg)			
	N	N*	%	N*	%	2 - 5	%
<b>Suínos</b>	<b>50</b>	<b>49</b>	<b>98</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1**</b>	<b>2</b>
<b>Aves</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	-	-	-	-

N número de amostras; \* < 2 µg/Kg foram consideradas negativas (limite de detecção 2 µg/kg); \*\* 4,1µg/kg.

Hamilton *et al.* (1982) observaram alguns surtos de micotoxicoses de ocorrência natural em aves e constatarem a presença de OTA nas rações, em níveis que variaram de 0,2 a 16 mg/Kg. Huff *et al.* (1988) e Gentels *et al.* (1999) relataram que frangos de corte, alimentados com rações contendo níveis de 2 mg/Kg apresentavam diminuição num ganho de peso, hipertrofia renal e hepática, e diminuição dos níveis séricos de proteínas totais, albuminas, globulinas e colesterol, e aumento dos valores de createnina e ácido úrico. Estes resultados estão de acordo com Mraz *et al.* (1992), onde se verificou redução num peso de frangos alimentados com 0,85 mg/Kg de OTA.

Rosmaninho *et al.* (2001), refere níveis de contaminação de 1-77 µg/Kg em rações para aves comercializadas no Brasil detectados em 100% das amostras testadas.

Num rastreio efectuado na Polónia por Chelkowski *et al.* (2001), verificou-se que 21,2 % de 316 amostras analisadas no período de 1990-1999, apresentaram contaminações por OTA, com níveis de 0,02–280 ng/g (média=29,7 ng/g. Estes resultados são significativamente superiores aos detectados neste estudo.

No que respeita à presença de OTA nas matérias-primas, há alguns relatos da sua ocorrência. Em França, Bacan (2001) reporta-se à presença de OTA em arroz, trigo, milho, cevada com níveis de contaminação de 1 a 30 µg/Kg, sendo o trigo o cereal cujos teres de contaminação foram mais elevados (20-30 µg/Kg). Outros resultados apresentados por

Bottalico e Logrieco (2001) revelaram a presença de OTA em 42 amostras de arroz colhidas em Itália, com níveis de contaminação superiores a 105,9 ng/g.

## CONCLUSÕES

A OTA é uma micotoxina que provoca efeitos adversos na saúde do Homem e dos animais afectando especialmente a função renal. A pesquisa desta micotoxina em géneros alimentícios e em alimentos para animais é um instrumento fundamental para controlar a respectiva ocorrência e prevenir os riscos associados. Este estudo, relativamente pioneiro em Portugal permite estabelecer e validar um procedimento analítico expedito e aplicá-lo a amostras colhidas a partir de produtos no comércio. Por outro lado, este estudo permitiu ainda que o método de HPLC desenvolvido tem funcionalidade adequada. Este estudo preliminar de OTA em alimentos compostos para suínos e aves, revelou que a ocorrência desta micotoxina parece ser muito baixa, na medida em que apenas uma amostra de ração para suínos estava contaminada (2%). Atendendo à baixa frequência das contaminações por OTA nas amostras testadas pretende-se verificar no futuro se a mesma tendência se regista noutros alimentos compostos e em géneros alimentícios (frutos e sementes secos).

## BIBLIOGRAFIA

- Austwick, P.K., 1975. Balkan nephropathy. *Proc. R. Soc. Med.*, 68: 219-221.
- Bacan, B. 2001. Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in plants, food and feed in France. In: COST – European cooperation in the field of scientific and technical research. Agriculture and Biotechnology. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe. Cost Action 835, Logrieco, A. (Ed.) Bari, Italy, pp. 44-53.
- Bernardo, F., 2004. Micotoxicoses: Gestão de Risco. Prova de Agregação. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, pp. 72.
- Betina, V., 1989. Aflatoxins, sterigmatocytins and versicolorins. *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier, New York, USA, pp. 114-150.
- Bottalico, A. e Logrieco, A., 2001 Occurrence of toxigénic fungi and mycotoxins in Italy. In: COST – European cooperation in the field of scientific and technical research. Agriculture and Biotechnology. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe. Cost Action 835. Logrieco, A. (Ed.), Bari, Italy, pp. 69-104.
- Carton, W. W. e KROGH, P., 1979. "Ochratoxins" IN: Conference on Mycotoxins in Animal Feed Grains Related to Animal Health. Food Drug Administration, USA, pp.165-287.

- Cheeke, P.R. e Shull, L.R., 1985. Natural toxicant in feeds and poisonous plants. AVI Publishing company, INC, Wesport-Connecticut, pp. 395-347.
- Chelkowski, J., Perkowski, J., Grabarkiewicz-SZEZLSNA, J., Kostecki, M. e Golinski, P., 2001. Toxigenic fungi and mycotoxins in cereal grains and feeds in Poland. In: COST – European cooperation in the field of scientific and technical research. Agriculture and Biotechnology. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe. Cost Action 835, Logrieco, A. (Ed.), Bari, Italy, pp. 111-130.
- Cole, R.J. e Cox, R.H., 1981. Hand book of toxic fungal metabolites. Academic Press New York, INC. USA, pp. 128-151.
- Entwistle, A. C. Williams, A. C., Mann, P. J. e Slack, P.T., 1999. Validation of Analytical Methods to determine the content of Aflatoxin, Ochratoxin and Patulin in Foodstuffs of vegetable origin. European Commission bcr information. Chemical Analysis, Report EUR 18954 EN.
- ENTWISTLE, A. C., WILLIAMS, A. C., MANN, P. J, e SLACK, P.T., 2000. Liquid Chromatography method with immunoaffinity column clean-up for determination of Ochratoxin A in barley: Collaborative study. Food chemical contaminants, J. AOAC International, 83:1377-1383.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2004. Food and Nutrión Paper Nº 81. Worldwide Regulations for Mycotoxins In Food and Feed In 2003. Rome, Italy, pp. 165.
- Galtier P., Alvinerie, M. e Charpentreau, J. L., 1981. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. Food Cosmet. Toxicol., 19: 735-738.
- Gentels, A., Smith, E., Kubna, L.F., Duffus, E. Johnson, P., Thompson, S., Harvey, R. B. e Edrington, T.S., 1999. Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxina A in broiler. Poultry Sci., 78:1380-1384.
- Hamilton, P.B., Huff, W.E., Harris, J.R. e Wyatt, R.D., 1982. Natural Occurrence of ochratoxicosis in poultry. Poultry Sci., 61:1832-1841.
- Horwitz, W., Kamps, L.R. e Boyer, K.W., 1980. Quality assurance in the analysis of food for trace constituents. J. Off. Anal. Chem. 63:1344-1347.
- Huff, W.E., Wyatt, T.L., Tucker, T.L. e Hamilton, P.B., 1988. Ochratoxicosis in the broiler chicken. Poultry Sci., 53:1585-1591.
- Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 1998. Anexo II, Directiva 98/591/CEE da comissão 17 de Julho de 1998. L201/100.
- Krogh, P., 1987. Mycotoxins in Food. P. Krogh (ed.), Academic Press, UK. pp. 1-122.
- Miller, D. e TRENHOLM, L., 1994, Mycotoxins in grain: compounds other than Ochratoxin. Ed. Eagan press, St Paul, Minnesota, USA. pp. 261-285.
- Mraz, A. e Kosutzky, J., 1992. Clinical effects and morphological changes after administration of low doses of ochratoxin A to broiler chicks. Vet. Med., 37:237-242.
- Ribeiro, J. M., Rosa, C. R., Corvello, F. A. e Fraga, M.E., 2000 Toxigenic microflora and mycotoxins (Aflatoxins and Ochratoxin A) in poultry feed in Rio de Janeiro, Brasil. In International IUPAC Symposium on micotoxins and phycotoxins, Guarujá Brasil, pp. 113.
- Rosmaninho, J. E., Oliveira, C.A.F. e Bittencourt, A.B.F., 2001. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. Arq. Inst. Biol., 68:107-114.

## BIOTRANSFORMATION PATHWAY IN FISH: AN ENVIRONMENTAL REVIEW

A. FONTAÍNHAS-FERNANDES<sup>1</sup>, F. PEIXOTO<sup>2</sup> e D. SANTOS<sup>1</sup>

1- UTAD-CITAB, Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas, Apartado 1013, 5000-911 Vila Real; 2- UTAD-CECAV, Apartado 1013, 5000-911 Vila Real, Portugal (fontain@utad.pt)

(Recepção: 20 de Junho de 2006; Aprovação: 1 de Setembro de 2006)

### ABSTRACT

The pollution of the aquatic environment with xenobiotics has become a worldwide problem during recent years, because they are indestructible and most of them have toxic effects on organisms. The biotransformation metabolism allows converting the pollutants in less toxic compounds, involving different enzymatic and non-enzymatic reactions. Xenobiotic may be biotransformed in the liver according the mechanism that can be divided into phases I, II and III. Phase I is a non-synthetic alteration (oxidation, reduction or hydrolysis) of the original foreign molecule, which can be conjugated in phase II and catabolized in phase III. The aim of this review article is to analyze the biotransformation metabolism in fish, according an environmental perspective.

**Key words:** biotransformation; environmental pollution, fish

## O MECANISMO DE BIOTRANSFORMAÇÃO NOS PEIXES: UMA PERSPECTIVA AMBIENTAL

### RESUMO

A poluição dos sistemas aquáticos causada pelos xenobióticos sistemas biológicos constitui um problema mundial nos últimos anos, dado que são compostos de difícil destruição e que causam efeitos tóxicos nos animais. O metabolismo de biotransformação permite a conversão dos xenobióticos, através de reacções enzimáticas e não enzimáticas, em metabolitos menos tóxicos e mais facilmente excretáveis do que o composto original. Os xenobióticos podem ser biotransformados no fígado através de um mecanismo que pode ser dividido nas fases I, II e III. A fase I consiste numa alteração não sintética (oxidação, redução ou hidrólise) da molécula estranha original, a qual pode ser conjugada na fase II e catabolizada na fase III. O objectivo deste artigo de revisão é o de analisar o metabolismo de biotransformação nos peixes, numa perspectiva ambiental

**Palavras-chave:** biotransformação; peixes, poluição ambiental

## INTRODUÇÃO

O ambiente está a ser constantemente agredido por diversos compostos orgânicos e inorgânicos estranhos aos sistemas biológicos, provenientes da actividade tecnológica humana resultante das comunidades urbanas, da indústria e da agricultura. Entre os contaminantes destacam-se ainda uma grande variedade de compostos naturais, designadamente, os metabolitos secundários sintetizados pelas plantas, as toxinas produzidas por fungos, plantas e animais, bem como os produtos formados através de transformações geoquímicas ou pirocatalíticas, em que se incluem os hidrocarbonetos. Estes compostos tóxicos, naturais ou antropogénicos, são genericamente referidos como xenobióticos e o seu impacto na vida aquática tem vindo a ser analisado em diversos estudos revistos por Fontáinhas-Fernandes *et al.* (2006).

Alguns dos compostos referidos podem depositar-se nos organismos e, consequentemente, acumulam-se na cadeia alimentar. O tema da bioacumulação tem vindo a ser objecto de análise em estudos, quer experimentais, quer de campo, revistos por Fontáinhas-Fernandes *et al.* (2006). Dado que alguns destes compostos possuem um carácter lipofílico sendo pouco solúveis em água, podem ser integrados na secção dos constituintes ricos em lípidos - os organismos vivos. Como consequência, os compostos químicos formam, por vezes, resíduos que podem persistir nos tecidos dos referidos organismos por muito tempo. Os compostos lipofílicos são de difícil excreção, sendo alguns metabolizados ou degradados lentamente, dado que persistem por um amplo período de tempo. Assim, a eliminação dos xenobióticos depende, na maioria dos casos, da sua conversão em compostos hidrossolúveis, através de um processo denominado biotransformação (Fontáinhas-Fernandes, 2005a).

O metabolismo de biotransformação pode ser dividido em duas fases: a fase I que envolve a alteração da estrutura molecular do substrato e a fase II que permite a conjugação do substrato com compostos endógenos. Commandeur *et al.* (1995) sugerem a existência da fase III, relacionada com a excreção do poluente. Este processo metabólico pode traduzir-se na destoxificação e numa maior solubilidade em água, aumentando a taxa de excreção.

O objectivo do presente artigo consiste na revisão segundo uma perspectiva ambiental, deste processo que consiste numa série de reacções em que participam sequencialmente diversas enzimas participam, e que leva à activação, destoxificação e, por fim, à excreção dos xenobióticos. De igual modo, abordam-se as reacções da fase I (envolvendo hidrólises, reduções e oxidações), que conduzem à alteração da molécula

estranha original, podendo esta ser conjugada na fase II (conjugação e destoxificação) e, por sua vez, catabolizada na fase III. Para tal, recorre-se à apresentação de resultados obtidos em estudos de natureza ambiental.

## **METABOLISMO DE BIOTRANSFORMAÇÃO**

As substâncias estranhas de diferente proveniência podem ser absorvidas pelos organismos vivos por várias vias, merecendo particular atenção a dieta e o meio envolvente. A pele, os pulmões e o tracto gastro-intestinal são as principais barreiras que separam os organismos superiores do ambiente, devendo os xenobióticos ultrapassar estas barreiras para exercer os seus efeitos nos locais de acção no organismo (Fontainhas-Fernandes *et al.*, 2006). No caso dos peixes, as brânquias assumem um papel crucial em estudos de toxicologia ambiental.

Os principais órgãos de armazenamento dos xenobióticos são o fígado e o rim. O fígado é considerado o principal órgão envolvido no metabolismo de bioacumulação, biotransformação e excreção de contaminantes (Fontainhas-Fernandes *et al.*, 2005b). Deste modo, os principais estudos realizados em condições laboratoriais e de campo neste domínio têm sido desenvolvidos em fígado, dado possuir uma concentração elevada de enzimas que participam no metabolismo de biotransformação e, por outro lado, apresentar uma dimensão relativamente considerável com uma reduzida diversidade (van der Oost *et al.*, 2003).

O principal papel da biotransformação nos mamíferos reside na conversão de compostos lipofílicos de difícil excreção em derivados hidrossolúveis, de modo a serem excretados mais rapidamente. Caso contrário, os xenobióticos acumulam-se no corpo dos mamíferos, aumentando a possibilidade de uma resposta tóxica. As reacções químicas envolvidas neste processo metabólico são similares às que ocorrem no processo de destoxificação e eliminação das moléculas produzidas pelo próprio organismo, como são os casos dos pigmentos biliares e das hormonas esteróides (Koolman e RÖhm, 1996).

As enzimas que participam no processo de biotransformação dos xenobióticos encontram-se amplamente distribuídas pelo organismo, repartindo-se por diversos compartimentos celulares. Nos vertebrados, o fígado é o principal local onde existe uma maior concentração de enzimas envolvidas neste processo, podendo também localizar-se na pele, pulmão, mucosa nasal, olho e no tracto gastro-intestinal (Fontainhas-Fernandes *et al.*,

2006). A maior parte destas reacções ocorre no retículo endoplasmático, embora o citoplasma e a mitocôndria também assumam um papel relevante.

Os xenobióticos seguem uma série de reacções, em que as diversas enzimas participam em etapas sequenciais, conduzindo à activação, destoxificação e sua excreção. Assim, tem sido generalizado o conceito de reacções da fase I, que se traduz na alteração da molécula estranha original. Por sua vez, esta fase pode ser complementada pela fase II que se traduz na conjugação e destoxificação do poluente, a qual é finalmente, catabolizada na fase III (Commandeur *et al.*, 1995). As enzimas da fase III, como as peptidases, hidrolases e liases, catalisam a degradação dos metabolitos conjugados, de modo a formarem produtos excretáveis (Van der Oost *et al.*, 2003).

### **Fase I**

As reacções da fase I consistem na incorporação de novos grupos funcionais, designadamente -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, ou -COOH, podendo também envolver a alteração de certos grupos presentes na molécula original. Este mecanismo traduz-se num aumento da hidrofília e no decréscimo da actividade biológica ou da toxicidade da substância (Fontainhas-Fernandes, 2005b). Em determinadas situações, as substâncias estranhas, casos de drogas e carcinogénios, apenas se tornam biologicamente activas, benéficas ou tóxicas, após terem sido submetidas às reacções da fase I.

As enzimas que intervêm na fase I localizam-se na membrana do retículo endoplasmático, embora as desidrogenases, em particular, a álcool desidrogenase e as peroxidases existam no citoplasma. Algumas enzimas situam-se no compartimento mitocondrial, designadamente a monoamina oxidase. As enzimas que predominam no metabolismo oxidativo microssomal são as mono-oxigenases, também referidas como oxidases de função mista. Estas enzimas promovem uma grande variedade de reacções químicas, formando intermediários instáveis e, por vezes, tóxicos. A primeira fase do metabolismo de biotransformação envolve principalmente reacções de hidrólise, redução ou oxidação. No entanto, os sistemas de oxidação-redução de álcoois, aldeídos e cetonas; bem como a monoamina oxidase, a diamino oxidase e a poliamino oxidase; e ainda a reacção de aromatização e a co-oxidação dependente da peroxidase, podem também revestir-se de particular importância, como pode se comprova na bibliografia da especialidade (Klaassen e Watkins, 2001).

### **Hidrólise**



As principais enzimas envolvidas na fase I são as carboxilesterases, peptidases e hidrolases epóxido. Os mamíferos possuem diversas carboxilesterases que hidrolisam xenobióticos, contendo grupos funcionais como os ésteres de ácidos carboxílicos, amida, tioéster, éster do ácido fosfórico e anidrido ácido. Este tipo de enzimas, além de participarem na hidrólise de diversos fármacos e xenobióticos, podem hidrolisar ou ligar-se aos pesticidas organofosforados (Fontainhas-Fernandes *et al.*, 2006).

Os péptidos são hidrolisados nos tecidos por diversas peptidases, entre as quais se incluem as aminopeptidases e as carboxipeptidases, que hidrolisam os aminoácidos nas extremidades N- e C- da cadeia, e as endopeptidases que, por sua vez, quebram os péptidos em locais específicos da molécula. As peptidases rompem a ligação amida entre aminoácidos adjacentes e, portanto, funcionam como amidases (Klaassen e Watkins, 2001).

Segundo estes autores, a hidrolase epóxido participa na adição de água para óxidos alcenos, epóxidos e arenos, que se formam durante a oxidação dependente do citocromo P450 dos alcenos alifáticos e hidrocarbonetos alifáticos, respectivamente. A hidrolase epóxido assume um papel chave na destoxicação dos epóxidos electrofílicos que podem ligar-se a proteínas e ácidos nucleicos, traduzindo-se em toxicidade celular e mutações genéticas. Esta enzima tem sido analisada na fracção microsomal de diversos tecidos. A distribuição das hidrolases epóxido é equivalente à do citocromo P450. A distribuição celular e a localização microsomal da hidrolase epóxido assegura a rápida destoxicação dos epóxidos, alcenos e dos óxidos arenos gerados pelo citocromo P450 (Klaassen e Watkins, 2001).

## **Redução**

Alguns compostos que contêm grupos aldeído, cetona, bissulfureto, sulfóxido, quinona, N-óxido, alceno, grupo azo ou nitro podem ser reduzidos *in vivo*, embora seja difícil confirmar se a reacção é produzida enzimaticamente pela interacção com agentes redutores (Klaassen e Watkins, 2001). Estes autores acrescentam que a azo- e nitro-redução, a redução no grupo carbonilo, a redução de bissulfuretos, bem como a redução sulfóxido e N-óxido e a des-halogenação são as principais reacções que se enquadram neste domínio.

## **Oxidação**

A oxidação constitui a primeira etapa no metabolismo de grande parte dos xenobióticos. Este tipo de processo envolve diversos sistemas enzimáticos que se traduzem na oxidação dos compostos químicos nos mamíferos (Klaassen e Watkins, 2001).

### **Mono-oxigenases contendo flavina**

As mono-oxigenases contendo FAD (FMOs), tal como o citocromo P450, são enzimas microssômicas que exigem NADPH e O<sub>2</sub>. Algumas das reacções catalisadas pelas FMOs também o são pelo citocromo P450. O fígado, o rim e o pulmão contêm uma ou mais mono-oxigenases que contêm FAD (FMOs) que oxidam os átomos de azoto, enxofre e fósforo, nucleófilos de diversos xenobióticos. (Klaassen e Watkins, 2001).

A FMO catalisa a oxidação de aminas terciárias nucleofílicas em N-óxidos, aminas secundárias a hidroxilaminas e nitronas, e as aminas primárias em hidroxilaminas e oximas. A FMO também oxida xenobióticos que possuem enxofre, como os tióis, tioésteres, tionas, tiocarbamatos, fosfinas S- e P-óxidos. Existem outros substratos para a FMO, casos das hidrazinas, iodetos, selenidos e compostos contendo boro e selenidos. O mecanismo de actuação deste tipo de enzimas foi revisto por Fontáinhas-Fernandes *et al.* (2006).

### **Citocromo P450**

O sistema citocromo P450, em termos de versatilidade catalítica e do número de xenobióticos que destoxifica ou activa para intermediários reactivos, é considerado o principal sistema enzimático no âmbito da fase I da biotransformação. Este tipo de enzimas existe em maior concentração no retículo endoplasmático do fígado, podendo estar presente em variados tecidos.

As enzimas P450 do fígado e de outros tecidos assumem funções relevantes no processo de actuação de xenobióticos em metabolitos tóxicos ou cancerígenos. Este tipo de enzimas também se revestem de um papel preponderante ao nível da biossíntese e catabolismo de hormonas esteróides, ácidos biliares, vitaminas lipossolúveis, ácidos gordos e eicosanóides, o que comprova a sua versatilidade catalítica (McKee e McKee, 2003).

O sistema citocromo P450 participa na catálise de diversos tipos de reacções de oxidação, designadamente na hidroxilação de um carbono alifático ou aromático, na epoxidação de uma ligação dupla, na oxigenação e N-hidroxilação de heteroátomos (S-, N- e I-), na desalquilação de heteroátomos, na transferência do grupo oxidativo e na clivagem de ésteres e mesmo de desidrogenação (Klaassen e Watkins, 2001).

É conhecido que existem diversas sequências de CYP450, tendo sido identificadas numerosas famílias e subfamílias em mais de 67 espécies (Nelson, 1995). A subfamília CYP1A é a forma mais estudada nos organismos aquáticos. Este sistema enzimático tem vindo a ser

muito utilizado como biomarcador de contaminação aquática, podendo ser induzidos por diversos compostos tóxicos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs) e dioxinas (Stegeman, 1993; Bucheli e Fent, 1995). Na realidade, diversos estudos científicos revistos por van der Oost *et al.* (2003) confirmaram a existência de um aumento significativo dos níveis de CYP1A em espécies provenientes de locais poluídos.

## Fase II

A fase II envolve a conjugação do xenobiótico original ou dos seus metabolitos com um composto endógeno. Este processo metabólico consiste em reacções de adição em que grupos químicos polares ou compostos como açúcares e aminoácidos se ligam, de uma forma covalente, a xenobióticos ou drogas (Lech e Vodicknick, 1985).

De um modo geral, as enzimas da fase II catalisam as reacções de conjugação, facilitando a excreção de compostos através da adição à molécula de grupos mais polares, em particular, da glutathione (GSH) e do ácido glucorónico (Commandeur *et al.*, 1995). Alguns xenobióticos possuem os grupos funcionais, casos do COOH, -OH ou -NH<sub>2</sub>, requeridos para a fase II, enquanto outros são metabolizados por um processo integrado que envolve a acção prévia das enzimas da fase I (George, 1994).

As reacções da fase II incluem a glucoronidação, sulfatação, acetilação, metilação, a conjugação com a glutathione (síntese do ácido mercaptúrico) e a conjugação com aminoácidos, tais como a glicina, taurina e ácido glutâmico. Os cofactores para estas reacções reagem com os grupos funcionais presentes nos xenobióticos ou que neles são introduzidos ou expostos durante as reacções da fase I, resultando num aumento significativo da hidrofília e, por isso, promovem a excreção dos químicos exógenos (Klaassen e Watkins, 2001). As enzimas da fase II situam-se no citosol, embora as UDP-glucuronosil-transferases constituam uma excepção, dado que são microsossomais (Klaassen e Watkins, 2001).

Neste domínio, existem outras vias de biotransformação de xenobióticos, embora o conhecimento actual em peixes seja de menor relevância. Entre estas, destacam-se a metilação, a acetilação, bem como a conjugação com aminoácidos. De igual modo, também é conhecida a conjugação de xenobióticos com a glutathione, sendo os substratos mais conhecidos diversos xenobióticos electrofílicos (Klaassen e Watkins, 2001). Estes autores referem que a conjugação com a glutathione representa uma reacção de destoxificação importante, uma vez que os electrófilos são espécies tóxicas que podem ligar-se a nucleófilos

críticos, designadamente proteínas e ácidos nucleicos, podendo causar lesões celulares e mutações genéticas.

### **UDP-glucoronosil transferases**

A principal via que conduz à inactivação, seguida da excreção de compostos endógenos e de xenobióticos nos mamíferos é a glucoronidação (Lech e Vodick, 1985; George, 1994). Trata-se de uma reacção que necessita de ácido uridino difosfato-glucorónico (ácido UDP-glucuronato) como cofactor, sendo a reacção principal catalisada pelas UDP-glucoronosil transferases (UDPGTs). Este tipo de enzimas localiza-se no retículo endoplasmático de diversos tecidos, em particular do fígado. Os principais substratos da glucoronidação contêm diversos grupos funcionais, designadamente álcoois alifáticos e fenóis, ácidos carboxílicos, aminas aromáticas, entre outros (Klaassen e Watkins, 2001).

As UDPGTs metabolizam diversos substratos endógenos, casos da bilirrubina e das hormonas da tiróide e esteróides. De salientar que os glucorónidos de hormonas esteróides formados nos testículos e vesículas seminais de peixes podem desempenhar um papel crucial como feromonas, actuando deste modo como estimulante da ovulação e da produção de esperma. Adicionalmente, também estão relacionados com o aumento da vitelogénese em diversas espécies de peixes (George, 1994).

Os conjugados glucorónidos, tanto de xenobióticos como de compostos endógenos representam conjugados polares de natureza hidrossolúvel, que podem ser eliminados dos organismos por via urinária e da bília. Diversos estudos efectuados em laboratório e no campo revistos por Van der Oost *et al.* (2003), comprovam que a actividade da UDPGT ao nível hepático aumenta em peixes expostos a diversos xenobióticos, nomeadamente PAHs e PCBs. De igual modo, estes autores sugerem que a actividade enzimática da UDPGT é o indicador da fase II que fornece uma melhor resposta à exposição a poluentes.

### **Sulfotransferases**

Diversos xenobióticos e substratos endógenos submetidos a glucoronidação também são passíveis de conjugação com o sulfato, resultando um éster de ácido sulfúrico hidrossolúvel. Trata-se de uma reacção que é catalisada pelas sulfotransferases, que integram um grupo de enzimas localizadas no fígado, rim, tracto gastro-intestinal, cérebro, entre outros locais (Klaassen e Watkins, 2001).

Este grupo é constituído por enzimas citosólicas que conjugam grupos hidroxilo de compostos poliaromáticos, álcoois alifáticos, aminas aromáticas, com o 3-fosfoadenosina-5-fosfosulfato (PAP), de modo a formar um sulfato monoéster (George, 1994). No entanto, a informação actual acerca desta matéria ainda é escassa ao nível dos peixes.

De um modo geral, os conjugados sulfato dos xenobióticos são excretados pela urina, sendo a bília uma via alternativa de excreção. A sulfatação é um meio efectivo de diminuição da actividade tóxica dos xenobióticos (Klaassen e Watkins, 2001). Contudo, estes autores referem que em certos casos a sulfatação aumenta a toxicidade dos xenobióticos, dado que alguns conjugados de sulfatos são muito instáveis e degeneram-se, formando espécies electrofílicas fortes.

## **O PAPEL DOS INDICADORES BIOQUÍMICOS EM ESTUDOS DE MONITORIZAÇÃO AMBIENTAL**

A monitorização de todos os contaminantes que constituem uma ameaça potencial para o ambiente é virtualmente impossível, quer sejam de origem antropogénica, quer naturais. Contudo, a necessidade de avaliar o impacto da poluição conduziu à análise de respostas bioquímicas que reflectem a potencialidade dos xenobióticos em prejudicar determinados processos fisiológicos (McCarthy e Shugart, 1990). A interpretação dos resultados de natureza bioquímica tem vindo a ser complementada com estudos de natureza histológica.

Neste contexto, o interesse da utilização de marcadores moleculares de efeito biológico de contaminantes nos organismos, conhecidos como biomarcadores tem vindo a aumentar em diversos estudos de ecotoxicologia e de toxicologia humana (Livingstone, 1993; Timbrell, 1996). Os biomarcadores representam alterações que se traduzem numa resposta biológica, desde os níveis molecular, celular e fisiológico até comportamental, podendo estar relacionados com a exposição a produtos químicos ou radiações libertadas no ambiente (Adams, 1990; Depledge *et al.*, 1993; Peakall, 1994). Do ponto de vista de aplicação prática, os principais grupos de biomarcadores que têm assumido uma maior relevância em estudos de toxicologia ambiental são: as enzimas de biotransformação; os parâmetros de stresse oxidativo (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione redutase e antioxidantes não enzimáticos); produtos de biotransformação; proteínas do stresse e metalotioninas; parâmetros hematológicos, imunológicos e neurotóxicos; indicadores

reprodutivos e endócrinos; parâmetros genotóxicos; indicadores fisiológicos e morfológicos (Fontaínhas-Fernandes, 2005a).

As alterações da actividade das enzimas de biotransformação representam os biomarcadores mais sensíveis, tendo os resultados de estudos realizados em diversas espécies de peixes sugerido que a actividade destas enzimas pode ser induzida ou inibida após a exposição a diversos xenobióticos. A título de exemplo, pode-se referir que se verificou a indução do citocromo P450 1A na presença de variados poluentes, sendo usada como biomarcador em sistemas aquáticos (Goksøyr e Forlin, 1992; Goksøyr, 1995).

Os resultados de diversos estudos desenvolvidos em peixes, que analisaram o efeito de diferentes poluentes ao nível das enzimas de biotransformação, designadamente do citocromo P450, citocromo b<sub>5</sub> e da etoxiresufina O-detilase (EROD) foram revistos por van der Oost *et al.* (2003). A título de exemplo pode-se referir que os níveis de EROD ao nível hepático aumentam com a exposição a paraquato (Fig. 1), um conhecido poluente utilizado em práticas agrícolas (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2006a).

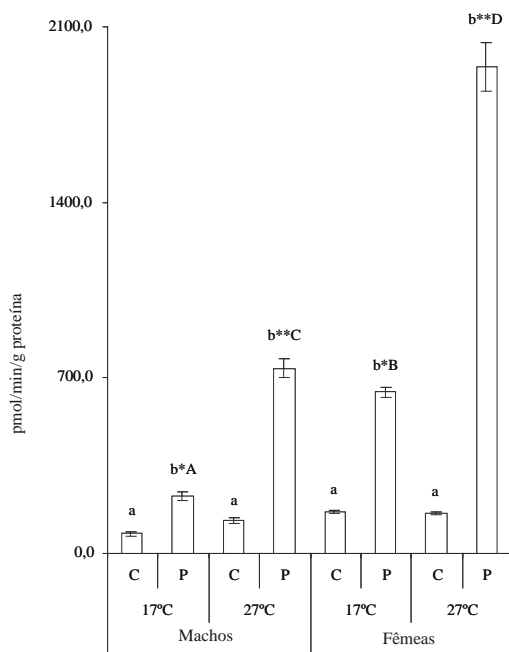


Figura 1 - Actividade da etoxiresufina O-detilase (EROD) em fígado de tilápia *O. niloticus* exposta a paraquato a 17 e 27 °C (adaptado de Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2006a).

Ao nível das enzimas envolvidas na fase II, alguns estudos têm vindo a testar o efeito de diversos poluentes na actividade enzimática da glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), da glutatona S-transferase (GST) e das UDP-glucuronosiltransferases (Gadagbui *et al.*, 1996; Martinez-Lara *et al.*, 1996; Stephensen *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Shailaja e D'Silva, 2003; Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2006b). Por exemplo e recorrendo novamente ao caso do paraquato, no Quadro I pode-se comprovar o efeito deste poluente ao nível da actividade enzimática da GSH.

QUADRO I - ACTIVIDADE DA GLUTATONA S-TRANSFERASE NO FÍGADO DE TILÁPIA *O. NILOTICUS* EXPOSTA A PARAQUATO A 17 E 27 °C (ADAPTADO DE FIGUEIREDO-FERNANDES *ET AL.*, 2006B).

Parâmetro		Glutationa S-transferase GST (U/g proteína)							
Temperatura		17 °C				27 °C			
Tratamento	Controlo	Paraquato		Controlo		Paraquato			
Machos	3.9±0.1	a	4.6±0.1	b	3.8±0.1	a	4.5±0.2	b	
		A		A		A		A	
Fêmeas	2.9±0.1	a	4.0±0.1	b	2.8±0.1	a	3.6±0.3	b	
		B		B		B		B	

Os valores são apresentados como sendo a média ± desvio padrão. Médias com diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes entre si em cada temperatura. Médias com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes entre si entre machos e fêmeas, em cada nível de tratamento.

Os poluentes também podem ter uma acção tóxica ao nível do stresse oxidativo. É conhecido que os sistemas de defesa dos peixes podem estar envolvidos no combate à formação de oxiradicaís, recorrendo às enzimas antioxidantes (Matos e Fontainhas-Fernandes, 2005). O conhecimento actual indica que a toxicidade do oxigénio tem uma acção nociva devido às espécies reactivas de oxigénio (EROs), resultantes da redução do oxigénio molecular, como são os casos do radical superóxido, do peróxido de hidrogénio e do radical hidroxilo (Di Giulio *et al.*, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1999; Peixoto *et al.*, 2003). Por sua vez, as denominadas EROs são capazes de reagir com biomoléculas, podendo-se traduzir na inactivação enzimática, na peroxidação lipídica, na alteração do DNA e até mesmo na morte da célula (Winston e Di Giulio, 1991). Existem sistemas de defesa que tendem a inibir a formação de oxiradicaís, entre os quais se incluem as enzimas antioxidantes, como a

superóxido dismutase (SOD), catalase, (CAT), glutathione peroxidase (GPOX) e a glutathione redutase (GRED). Estes parâmetros de stress oxidativo têm sido muito utilizados em estudos de monitorização ambiental (Ploch *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2005; Peixoto *et al.*, 2006; Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2006b).

A SOD representa um grupo de metaloenzimas que catalisam a conversão de aniões superóxido em peróxido de hidrogénio, o qual representa uma conhecida EROs. Os estudos efectuados mostram existir, de uma forma geral, um incremento da actividade enzimática da SOD em peixes expostos a diversos poluentes, embora os resultados não sejam consensuais (ver revisão de van der Oost *et al.*, 2003).

As CATs são enzimas que promovem a remoção do peróxido de hidrogénio, que é metabolizado em oxigénio molecular e água (Filho, 1996). As alterações na sua actividade podem ser de difícil interpretação, dado que se tratam de enzimas que se localizam nos peroxissomas da maioria das células e estão envolvidas no metabolismo dos ácidos gordos (Stegeman *et al.*, 1992). O aumento da actividade enzimática da CAT foi registado em estudos efectuados em peixes expostos a diversos poluentes, embora em condições experimentais não mostrem existir alterações significativas. A actividade da CAT não tem sido considerada um biomarcador consistente, dado que se verifica tanto a indução como a inibição após a exposição a poluentes (van der Oost *et al.*, 2003).

QUADRO II - ACTIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE E DA GLUTATHIONE REDUTASE NO FÍGADO DE TILÁPIA *O. NILOTICUS* EXPOSTA A PARAQUATO A 17 E 27 °C (ADAPTADO DE FIGUEIREDO-FERNANDES *ET AL.*, 2006b).

Enzima	Temperatura Tratamento	17 °C		27 °C	
		Controlo	Paraquato	Controlo	Paraquato
Superóxido dismutase SOD (U/g proteína)	Machos	4.3±0.11 a	5.1±0.1 b	4.1±0.1 a	4.8±0.2 b
		A	A	A	A
	Fêmeas	3.1±0.1 a	5.1±0.1 b	3.0±0.1 a	3.9±0.3 b
		B	B	B	B
Glutathione redutase GR (U/g proteína)	Machos	6.9±0.4	7.4±0.3	6.5±0.2	8.0±0.6
	Fêmeas	6.2±0.2 a	9.1±0.4 b	5.8±0.2 a	8.0±1.1 b

Os valores são apresentados como sendo a média ± desvio padrão. Médias com diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes entre si em cada temperatura. Médias com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes entre si entre machos e fêmeas, em cada nível de tratamento.

As peroxidases são enzimas que reduzem uma diversidade de peróxidos nos seus correspondentes álcoois. A CAT é uma enzima muito particular pois utiliza uma molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como dador na redução de outra molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto as peroxidases utilizam outros redutores. A principal peroxidase existente nos peixes é uma enzima dependente do selénio, que utiliza a GSH como cofactor. A glutathione peroxidase catalisa o metabolismo do



$H_2O_2$  em água, envolvendo a concomitante oxidação da GSH reduzida para a sua forma oxidada (GSSG). Determinados estudos revelam existir um aumento da actividade desta enzima em peixes que foram expostos a poluentes, enquanto outros estudos referem um decréscimo de actividade enzimática (ver revisão de van der Oost *et al.*, 2003). No Quadro II pode-se comprovar o efeito do paraquato ao nível da actividade enzimática da SOD e da GRED. A GRED também tem merecido atenção devido à sua importância na manutenção do equilíbrio GSH/GSSG em condições de stresse oxidativo, embora não esteja envolvida no processo de defesa antioxidante do mesmo modo do que as enzimas anteriormente mencionadas (Winston e Di Giulio, 1991). Esta enzima, catalisa a transformação da forma oxidada da glutatona (GSSG) para a reduzida (GSH), com a concomitante oxidação do NADPH em  $NADP^+$ . Embora não se trate de um assunto consensual, determinados estudos revelam existir um aumento da sua actividade enzimática em condições experimentais e de campo, em peixes expostos a diversos poluentes (ver revisão de van der Oost *et al.*, 2003). A alteração do perfil dos ácidos gordos constituintes das membranas celulares podem ser também utilizados como biomarcadores (Peixoto *et al.*, 2006), assim como a oxidação dos grupos carbonílicos proteicos e a produção de bases nucleotídicas oxidadas (ex. 8-hidroxi-desoxiguanosina) ou outros derivados de DNA (Yamazaki *et al.*, 2004; Orhan *et al.*, 2005).

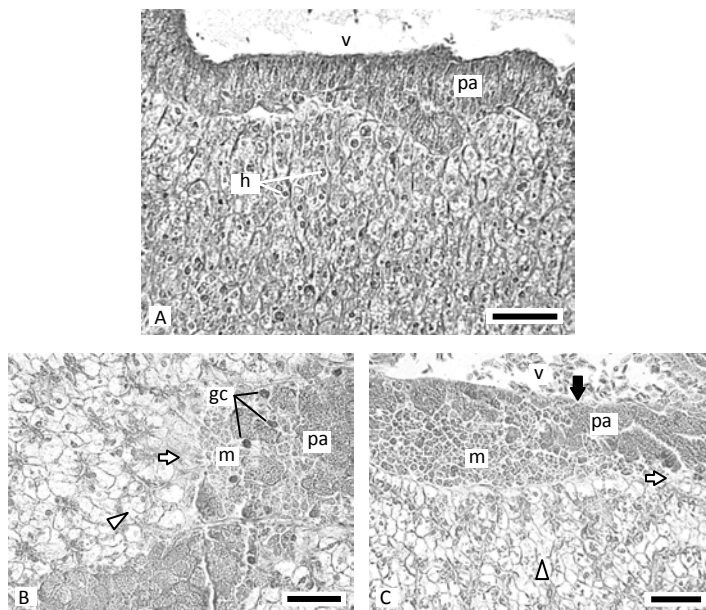


Figura 2 - Fotografias de fígado de tilápia *O. niloticus* (grupo controlo) aclimatado a 27 °C (A). h, hepatócitos; v, elemento venoso; pa, área pancreática que corresponde a pâncreas exócrino. B e C representam secções e peixes expostos a paraquato mantidos a 17 (B) e 27 °C (C), revelando algumas

rupturas da membrana dos hepatócitos (setas), uma discontinuidade próxima da área pancreática (setas brancas) e células eosinófilas (gc) a 17 °C. O endotélio do elemento venoso central mostra algumas rupturas (seta preta) e agregados macrofágicos (m) a 27 °C. H&E, barra = 50µm. (adaptado de Figueiredo-Fernandes et al., 2006a).

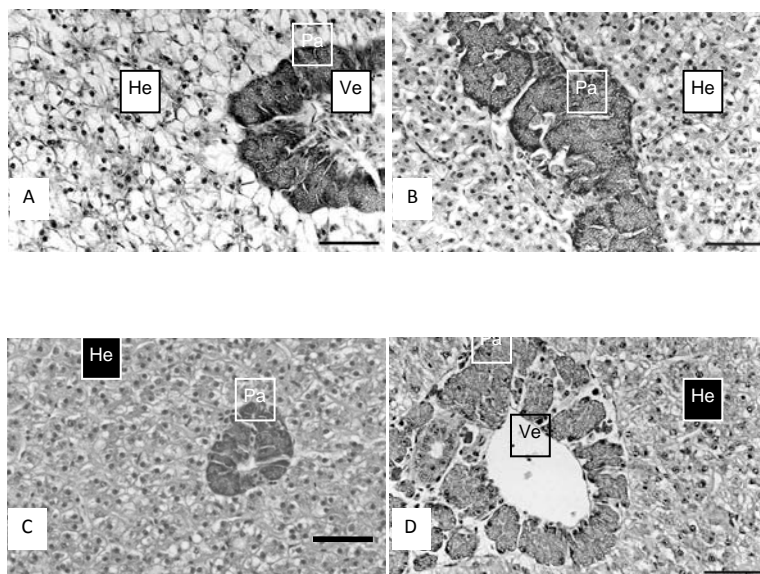


Figura 3 - Fotografias de fígado de tilápia *O. niloticus*. Grupo controlo (A) e peixes expostos a mancozeb (B - 1.0 mg.L<sup>-1</sup>; C - 2.5 mg.L<sup>-1</sup>; D - 5.0 mg.L<sup>-1</sup>), mostrando um aumento gradual de basofilia do parênquima hepático (ilustrado pelo aumento de hepatócitos mais escuros - He); as áreas mais escuras (ligeiramente granuladas) correspondem a células exócrinas do pâncreas (Pa), que tipicamente envolvem veias aferentes (Ve). H&E, barra = 50µm (adaptado de Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2006c).

Por último, importa frisar que muitos dos estudos de toxicologia ambiental efectuados em peixes e que recorrem à utilização de parâmetros bioquímicos apresentam adicionalmente resultados de natureza histológica (Fig. 2). Na realidade, o estudo das alterações histológicas, designadamente ao nível do fígado (Fig. 3), pode constituir uma ferramenta muito válida para confirmar os resultados de natureza bioquímica.

## BIBLIOGRAFIA

Adams, S.M., 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. Am. Fish. Soc. Symp., 8: 1-8.

- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C. e Novelli, L.B., 2002. The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to *in vivo* cadmium contamination. *Environ. Int.*, 27: 673-679.
- Bucheli, T.D. e Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 25: 201-268.
- Commandeur, J.N.M., Stijntjes, G.J. e Vermeulen, N.P.E., 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.*, 47: 271-330.
- Depledge, M.H., Amaral-Mendes, J.J., Daniel, B., Halbrook, R.S., Kloepper-Sams, P., Moore, M.N. e Peakall, D.B., 1993. The conceptual basis of the biomarker approach. In: D.B. Peakall e L.R. Shugart (eds), *Biomarkers*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 15-29.
- Di Giulio, R.T., WASHBURN, P.C., WENNING, R.J., WINSTON, G.W. e JEWELL, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 1103-1123.
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F. e Salgado, M.A., 2007. Bioaccumulation of heavy metals in *Mugil saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxic. Environ. Saf.*, 66: 426 - 431.
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P. e Reis-Henriques, M.A., 2005. Oxidative stress biomarker in two resistant species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro estuary, Portugal. *Aquat. Toxicol.*, 71: 39-48.
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E. e Reis-Henriques, M.A., 2006a. Effects of gender and temperature on hepatic EROD activity, liver and gonadal histology in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51: 626 – 632.
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Rocha, E. e Reis-Henriques, M.A., 2006b. Effect of paraquat on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus* at two levels of temperature. *Pest. Biochem. Physiol.*, 85: 97-103.
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Monteiro, R., Reis-Henriques, M.A. e Rocha, E., 2006c. Effects of the fungicide mancozeb in the liver structure of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* - Assessment and quantification of induced cytological changes using qualitative histopathology and the stereological point-sampled intercept method. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76 (2): 249-255.
- Filho, D.W., 1996. Fish antioxidant defenses - a comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29: 1735-1742.
- Fontainhas-Fernandes, A., 2005a. O Uso de Biomarcadores em Toxicologia Aquática. Série Didáctica - Ciências Aplicadas, UTAD, 39 p.
- Fontainhas-Fernandes, A., 2005b. Biotransformação. Sumário da Lição de Síntese apresentada para Provas de Agregação, UTAD, 34 p.
- Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F. e Santos, D.L., 2006. Biotransformação. Série Didáctica - Ciências Aplicadas, UTAD, 41 p.
- Gadagbui, B.K.M., Addy, M. e Goksøyr, A., 1996. Species characteristics of hepatic biotransformation enzymes in two tropical freshwater teleosts, tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mudfish (*Clarias anguillaris*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 114: 201-211.

- George, S.G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives, D. C. Malins e G. K. Ostrander (eds). Lewis Publishers, Florida, USA, pp. 37-85.
- Goksøyr, A. e Forlin, L., 1992. The cytochrome P450 system in fish. Aquatic toxicology and environmental monitoring. Aquat. Toxicol., 22: 287-262.
- Goksøyr, A., 1995. Use of cytochrome P450 (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. Arch. Toxicol. Suppl., 17: 80-95.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, T<sup>rd</sup> Ed., Oxford, 936 p.
- Klaassen, C.D. e Watkins, J.B., 2001. Casarett & Doull's, Toxicology. The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, 6<sup>th</sup> Ed., 1236 p.
- Koolman, J. e Röhn, K-H., 1996. Color Atlas of Biochemistry. Thieme, New York, 435p.
- Lech, J.J. e Vodcnik, M.J., 1985. Biotransformation. In: Tand, G.M. e Petrocelli, S.R. (eds), Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA, pp. 526-557.
- Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. J. Chem. Tech. Biotech., 57: 195-211.
- Martinez-Lara, E., Toribio, F., López-Barea, J. e Bárcena, J.A., 1996. Glutathione-S-transferase isoenzyme patterns in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants. Comp. Biochem. Physiol., 113: 215-220.
- Matos, P. e Fontainhas-Fernandes, A., 2005. Defesas antioxidantes em animais. Rev. Port. Zoo., XII (I): 101-123.
- McCarthy, J.F. e Shugart, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy, J.F. e Shugart, L.R. (eds), Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3-16.
- McKee, T. e McKee, J.R., 2003. Biochemistry of the Molecular Basis of Life. McGraw-Hill Company, 3<sup>rd</sup> edition, Boston.
- NELSON, D.R., 1995. Cytochrome P450 nomenclature and alignment of selected sequences. In: de Montellano, Ortiz (ed), Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry. Plenum, New York, pp. 575-606.
- Orhan, H, Van Holland, B., Krab, B., Moeken, J., Vermeulen, N.P.E., Hollander, P., and Meerman, J.H.N., 2005, Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion as a biomarker for estimating DNA oxidation in patients undergoing external radiotherapy and/or brachytherapy. Oncol. Rep., 13 (5): 847-851.
- Peakall, D.W., 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. Toxicol. Ecotoxicol. News, 1: 55-60.
- Peixoto, F., Santos, D. e Fontainhas-Fernandes, A., 2003. Métodos para Análise de Espécies Reactivas de Oxigénio e Antioxidantes em Sistemas Biológicos. Série Didáctica - Ciências Puras, UTAD, 47 p.
- Peixoto, F., Simões, D., Santos, D. e Fontainhas-Fernandes, A., 2006. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. Pestic. Biochem. Physiol., 85: 91-96.

- Ploch, S.A., Lee, Y-P., MacLean, E. e Di Giulio, R.T., 1999. Oxidative stress in liver of brown bulhead and channel catfish following exposure to tert-butyl hydroperoxide. *Aquat. Toxic.*, 46: 231-240.
- Shailaja, M.S. e D'Silva, C., 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere*, 53: 835-841.
- Stegeman, J.J., 1993. Cytochrome P450 forms in fish. In: Schenkman, J.B. e Greim, H. (eds), *Handbook of experimental Pharmacology*, vol. 105. Springer-Verlag, Berlin, pp. 279-291.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Forlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M. e van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M. e Bergman, H.L. (Eds), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 235-335.
- Stephensen, E., Sturve, J. e Förlin, L., 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout live, *Comp. Biochem. Physiol.*, 13: 435-442.
- Timbrell, J.A., 1996. Editorial. *Biomarkers*, (1): 1-2.
- Van der Oost, R., Beyer, J. e Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57-149.
- Winston, G.W. e Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19: 137-161.
- Yamazaki, H., Inoue, T., Koizumi, M., Tanaka, E., Yoshioka, Y., Nakamura, H., Shuo, X. and Inoue, T., 2004, Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: Increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radical Res.*, 38 (12): 1269-1279.



## INFLUENCE OF IMPROVED PASTURES ON ANIMAL BEHAVIOUR DURING GRAZING IN THE MONTADO

H. BABO<sup>1</sup>, J. LOPES<sup>2</sup>, D. NAVAS<sup>3</sup> e J. POTES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Associação Portuguesa de Caprincultores da Raça Serpentina, Apartado 194, 7002-503 Évora; <sup>2</sup>Associação de Criadores de Bovinos Mertolengos, Apartado 466, 7006-806 Évora; <sup>3</sup>Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, Estrada de Gil Vaz, Apartado 6, 7350-951 Elvas; [enmp.inia@mail.telepac.pt](mailto:enmp.inia@mail.telepac.pt)

(Recepção: 1 de Março de 2006; Aprovação: 15 de Setembro de 2006)

### ABSTRACT

In 1998 was installed, in four different sites, a trial of improved Mediterranean pastures in the Montado ecosystem with four treatments involving, addition of lime and fertilization (T2) and introduction of annual legumes, established by direct sowing (T3) or soil mobilization (T4) and witness (T1). Each treatment was submitted to 4 distinct grazing systems, with only one animal species (cattle, sheep, goat) or with all three together, always using the same stocking rate (live weight ha<sup>-1</sup>). The grazing periods were held at intervals of 2 to 3 months to include the different seasons of the year. The animal presences in the different treatments were recorded during two hours early in the morning and two hours later in the afternoon. The results obtained between 2002 and 2004, show that the behaviour of the animals during grazing was influenced by the treatment, grazing conditions, seasons of the year and the year itself. All animal species preferred the treatment with sown pastures and mobilized soil, and dedicated less time grazing in the spring.

**Key words:** Animal behaviour, montado, grazing

## INFLUÊNCIA DO MELHORAMENTO DE PASTAGENS NO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS EM PASTOREIO NO MONTADO

### RESUMO

Em 1998 foi instalado em quatro locais um ensaio de melhoramento de pastagens de sequeiro mediterrânico em Montado com quatro tratamentos, envolvendo calagem e fertilização (T2) e introdução de leguminosas anuais de ressementeira natural, por sementeira directa (T3) ou com mobilização de solo (T4) e testemunha (T1). Cada tratamento foi submetido a 4 pastoreios distintos, através de uma só espécie animal (bovinos, ovinos, caprinos) ou das três em conjunto, utilizando sempre a mesma carga animal (peso vivo ha<sup>-1</sup>). Os períodos de pastoreio realizaram-se com intervalos de 2 a 3 meses, de forma a englobar as diversas estações do ano. Foram registadas as presenças dos animais nos diferentes talhões

durante 2 horas ao princípio da manhã e 2 ao fim da tarde. Os resultados obtidos entre 2002 e 2004, demonstram que o comportamento dos animais em pastoreio foi influenciado pelo tratamento, pastoreio, estação do ano e ano. Todas as espécies preferiram o pastoreio no tratamento semeado com mobilização do solo e dedicaram menos tempo ao pastoreio na época da primavera.

**Palavras-chave:** Comportamento animal, montado, pastoreio

## INTRODUÇÃO

O montado é um sistema agrosilvopastoril de reconhecida antiguidade, constituindo ainda nos dias de hoje um sistema de produção sustentável ao qual é indispensável a intervenção do homem, a quem compete gerir os recursos de forma a manter o frágil equilíbrio que o caracteriza (Potes e Babo, 2003). Neste complexo conjunto de interações, o Montado alberga, para além da carga cinegética que possa existir, uma pecuária praticada em regime extensivo pelas quatro espécies animais (bovinos, ovinos, caprinos e suínos) em equilíbrio com o meio natural pobre, que permite no entanto uma competitividade de efeitos não necessariamente desfavoráveis, e que bem geridos podem constituir uma mais valia.

O facto de diferentes espécies de animais domésticos utilizarem a mesma pastagem, mesmo que simultaneamente, não significa que ocupem o mesmo nicho e estejam em directa competição pelos mesmos recursos forrageiros. De facto, Araújo filho e Crispin (2002) referem que bovinos, caprinos e ovinos exibem diferenças marcantes na composição botânica da sua dieta e estratégia de pastoreio como resposta à disponibilidade do alimento, estação do ano, intensidade de pastoreio e factores morfológicos do animal.

Marques e Belo (2001) estudaram o comportamento animal em pastoreio e concluíram que a quantidade de alimento ingerida pelos animais é fortemente influenciável por factores ligados à pastagem: a disponibilidade da erva, a composição florística, a distribuição espacial das plantas, o estado vegetativo, a altura e a relação folhas/caules; por factores ambientais: principalmente a temperatura, a humidade relativa e a velocidade do vento, que podem modificar o tempo e os períodos de pastoreio ao longo do dia; e ainda por factores físicos, fisiológicos e comportamentais, ligados ao próprio animal. Por outro lado, Pereira *et al.* (2000) referem a influência do tipo de pastagem no comportamento do animal em pastoreio (preferência pelas gramíneas no caso dos caprinos e gramíneas e leguminosas por parte dos ovinos), mas também a influência do tipo de pastoreio na composição da pastagem (maior capacidade de controlo das outras no pastoreio por bovinos com benefício na quantidade de leguminosas e melhor gestão da qualidade das pastagens em pastoreio misto).



Este trabalho foi inserido num estudo mais alargado no âmbito do projecto AGRO n.º 49 intitulado “Demonstração da sustentabilidade da pecuária extensiva praticada no ecossistema montado” que decorrem no Perímetro Florestal da Contenda em Barrancos, e tem como objectivo contribuir para o conhecimento das preferências dos animais em relação a três formas de melhoramento de pastagens, proporcionando uma base de dados sobre o comportamento em pastoreio das três espécies pecuárias de ruminantes exploradas em sistema de produção extensivo mediterrânico através de raças autóctones com o objectivo de encontrar formas de intervenção no sistema, que resultem na melhoria da sua produtividade.

## METODOLOGIA

Numa zona de montado de pastagens naturais, sem calagem nem fertilização há mais de 20 anos, foi instalado em 1998 um ensaio de melhoramento de pastagens, com quatro tratamentos distintos:

Tratamento 1 (T1): Manutenção do ecossistema existente com pastagem natural;

Tratamento 2 (T2): Calagem (2000kg/ha) e fertilização fosfatada (46kg de  $P_2O_5$ /ha);

Tratamento 3 (T3): Calagem (2000kg/ha), fertilização fosfatada (46kg de  $P_2O_5$ /ha) e introdução de leguminosas anuais de ressementeira natural, sem mobilização de solo (sementeira directa);

Tratamento 4 (T4): Calagem (2000kg/ha), fertilização fosfatada (46kg de  $P_2O_5$ /ha) e introdução de leguminosas anuais de ressementeira natural, com mobilização de solo.

Os tratamentos com 1600 m<sup>2</sup> cada, foram subdivididos em quatro talhões de 400m<sup>2</sup> utilizados pelos seguintes sistemas de pastoreio:

Pastoreio de Bovinos (PB);

Pastoreio de Caprinos (PC);

Pastoreio de Ovinos (PO);

Pastoreio misto, com as três espécies em simultâneo (PM).

Este esquema foi repetido quatro vezes.

Os animais foram escolhidos aleatoriamente, de entre os efectivos da exploração, de forma que a carga animal fosse sempre de 1780 kg de peso vivo por ha, o que correspondeu a

---

5 vacas da raça Mertolenga no PB; 46 cabras da raça Serpentina no PC; 45 ovelhas da raça Merino Preto em PO e 2 novilhas, 13 cabras e 15 ovelhas, das raças acima referidas no PM. Tomando como referência para a cabeça normal (CN), uma vaca adulta de 500 kg de peso vivo, dará uma carga instantânea de 3.6 CN/ha.

Os períodos de pastoreio foram entre 5 a 15 dias conforme a estação e a produção de pastagem, com intervalos de 2 a 3 meses de forma a englobar as diversas estações do ano: Primavera, Outono e Inverno.

A preferência dos animais pelos diferentes tratamentos foi registada durante os períodos de pastoreio, com observações diárias de 10 em 10 minutos, segundo metodologia já descrita em Marques e Belo (2001), durante 2 períodos de 2 horas, um pela manhã e outro ao fim da tarde. O horário das observações foi escolhido de forma a abranger simultaneamente em cada estação o período de pastoreio de todas as espécies, o qual é naturalmente diverso e inconstante ao longo do ano.

No presente trabalho foram analisados apenas os resultados referentes ao comportamento animal das diferentes espécies durante o período de 2002 a 2004.

Para se analisarem as presenças, nos vários talhões de animais de espécies diferentes, houve a necessidade de reduzir a uma unidade homogénea a presença de todos os animais em estudo (vaca adulta da raça em estudo). Assim, o registo de presenças animais foi multiplicado pelo respectivo peso vivo e o valor encontrado dividido pelo peso vivo médio da vaca adulta do ensaio. Analisaram-se os resultados das presenças em pastoreio durante a manhã (Ppm), a tarde (Ppt) e a média dos dois considerando as presenças em pastoreio no dia (Ppd)

Os resultados foram analisados por análise de variância, pelo procedimento GLM do programa estatístico do SAS (1986). O desenho experimental utilizado, foi o de blocos casualizados, funcionando as repetições e o ano como bloco. O modelo utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + T_j + P_k + R_l + E_m + (TxP)_{jk} + (TxE)_{jm} + (Px E)_{km} + (TxPx E)_{jkm} + \varepsilon_{ijklm}$$

$Y_{ijklm}$  representa cada uma das variáveis para o ano  $i$ , tratamento  $j$ , pastoreio  $k$ , repetição  $l$  a época  $m$ ;  $\mu$  a média da população para cada variável;  $A_i$  o efeito do ano (2002, 2003 e 2004);  $T_j$  o efeito do tratamento (T1, T2, T3 e T4);  $P_k$  o efeito do pastoreio (caprinos, bovinos, ovinos e misto);  $R_l$  o efeito da repetição (1, 2, 3 e 4) e  $E_m$  o efeito da época (Inverno, Primavera e Outono); sendo  $\varepsilon_{ijklm}$  o erro aleatório. O efeito dos blocos (ano e repetição) e as

interacções quando não significativas foram retiradas do modelo, sendo o seu efeito incluído no erro. No caso das interacções significativas, a separação das médias fez-se pela diferença mínima significativa (LSD).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos do tratamento, pastoreio, época do ano e ano foram analisados separadamente para os períodos da manhã, período da tarde e para o dia. Os resultados obtidos estão resumidos no Quadro I.

QUADRO I – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA, MÉDIA E “STANDARD ERROR” PARA OS PRINCIPAIS EFEITOS (TRATAMENTO, PASTOREIO, ÉPOCA E ANO) DAS VARIÁVEIS (PRESENÇAS NO PASTOREIO DA MANHÃ (PPM), TARDE (PPT) E DIA (PPD)). NO FINAL ENCONTRA-SE A SIGNIFICÂNCIA PARA AS INTERACÇÕES.

		Ppm	Ppt	Ppd
Tratamento	T1	4,4	6,7 <sup>a</sup>	5,5 <sup>a</sup>
	T2	4,7	7,1 <sup>a</sup>	5,9 <sup>a</sup>
	T3	4,6	7,6 <sup>ab</sup>	6,0 <sup>a</sup>
	T4	5,5	8,4 <sup>b</sup>	6,9 <sup>b</sup>
	Erro padrão	0,34	0,37	0,26
Pastoreio	P Bov	3,6 <sup>a</sup>	9,1 <sup>c</sup>	6,3 <sup>b</sup>
	P Cap	5,5 <sup>b</sup>	8,1 <sup>bc</sup>	6,8 <sup>b</sup>
	P Mist	5,2 <sup>b</sup>	7,5 <sup>b</sup>	6,3 <sup>b</sup>
	P Ovi	4,9 <sup>b</sup>	5,1 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>
	Erro padrão	0,34	0,37	0,27
Época	Inverno	5,0	8,5 <sup>b</sup>	6,8 <sup>b</sup>
	Outono	5,2	8,6 <sup>b</sup>	6,8 <sup>b</sup>
	Primavera	4,2	5,2 <sup>a</sup>	4,7 <sup>a</sup>
	Erro padrão	0,27	0,29	0,21
Ano	2002	5,2	8,1 <sup>b</sup>	6,7 <sup>b</sup>
	2003	4,7	6,8 <sup>a</sup>	5,7 <sup>a</sup>
	2004	4,3	7,5 <sup>ab</sup>	5,9 <sup>a</sup>
	Erro padrão	0,27	0,29	0,21
Tratamento x Pastoreio		NS	NS	NS
Tratamento x Época		NS	NS	NS
Pastoreio x Época		***	***	***
Tratamento x Pastoreio x Época		NS	**	NS
Sig do Mod		***	***	***

Os valores afectados de índices diferentes para cada variável e efeito principal são estatisticamente significativos (\*) \*- significativo P < 0,05; \*\* - significativo P < 0,01; \*\*\* - significativo P < 0,001; N. S. – não significativo

Da análise estatística dos resultados (Quadro I), pode-se verificar que durante os períodos de observação, os animais se encontraram em pastoreio mais frequentemente no tratamento 4. Pode-se também observar (Fig. 1) que as presenças em pastoreio durante o período da tarde parecem ter sido sempre superiores às da manhã para todos os tratamentos, um comportamento semelhante foi encontrado por Marques e Belo (2001).

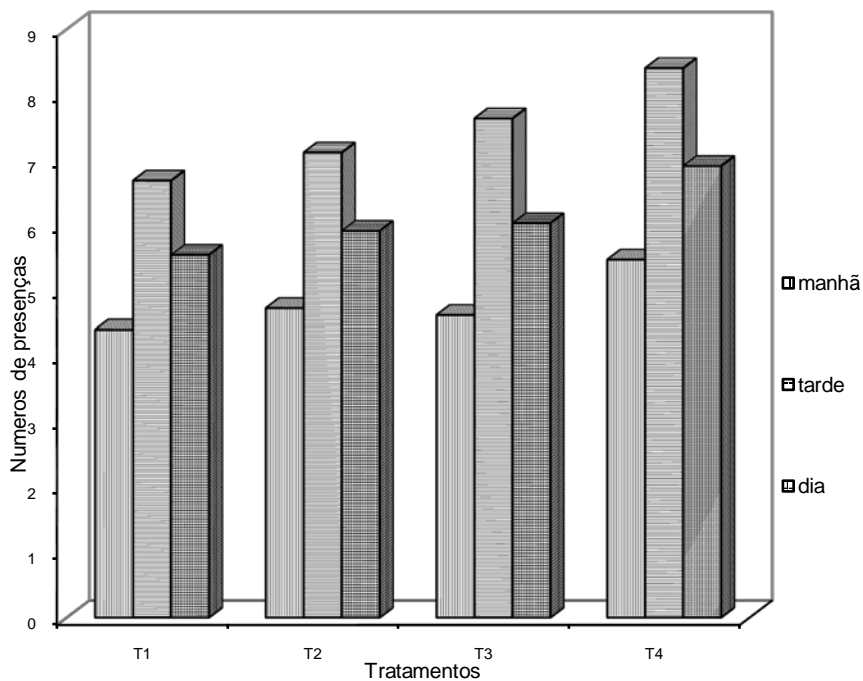


Figura 1 – Presenças em pastoreio em cada tratamento.

No que se refere ao tempo dispendido pelas diferentes espécies em pastoreio, apenas os ovinos se encontraram em pastoreio menos tempo durante o dia, tendo-se verificado o mesmo para o período da tarde (Quadro I, Fig. 2).

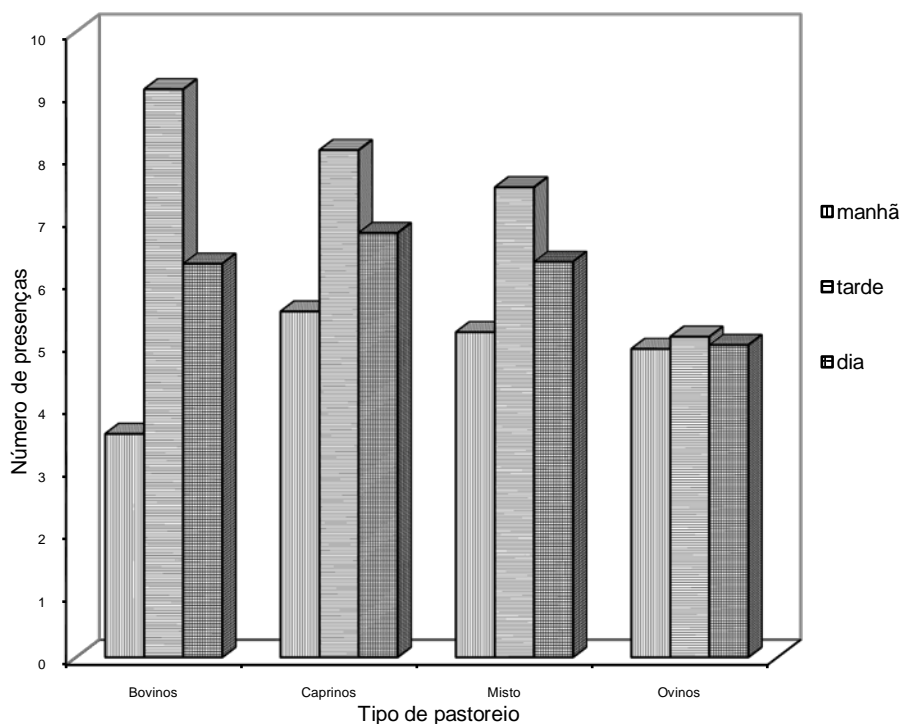


Figura 2 - Presença em pastoreio de cada espécie.

Quanto ao tempo de pastoreio dos bovinos, pode-se observar (Quadro I, Figura 2), que foi o tipo de pastoreio que obteve menos registos durante a manhã, mas que foi compensado pelo pastoreio da tarde, o qual foi superior aos restantes e semelhante ao dos caprinos.

A influência da estação do ano (época) no tempo de pastoreio (Quadro I, Fig. 3), mostra que os animais na Primavera, talvez devido à melhor qualidade da pastagem, apresentam-se menos vezes em pastoreio durante o dia, devendo-se esta diferença ao tempo de pastoreio durante o período da tarde.

Como seria de esperar, a influência do ano reflectiu-se na presença dos animais em pastoreio (Quadro I).

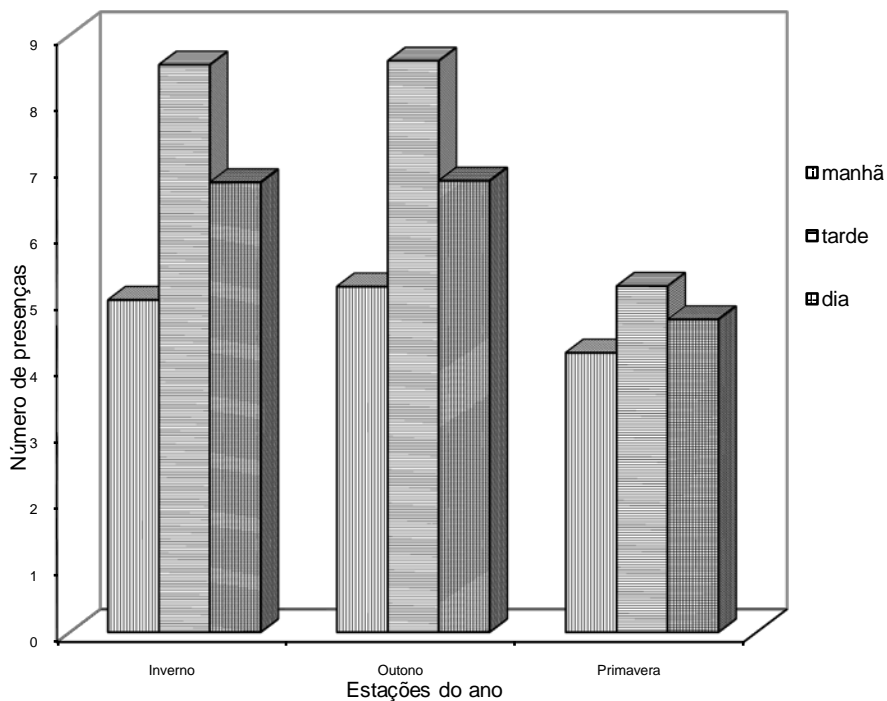


Figura 3 - Presença em pastoreio por época do ano.

Da análise da interacção pastoreio x época (Fig. 4), pode-se concluir que os bovinos foram a única espécie que durante o período de observação pastoreou significativamente menos tempo no Inverno (5.3 PB; 7.8 PC; 7.9 PO) do que na Primavera (6.5 PB; 6.1 PC; 1.8 PO). Santos *et al.* (2001) obtiveram resultados semelhantes entre a Primavera e o Inverno, embora neste caso os bovinos, na Serra da Peneda, se encontrem recolhidos nas cortes durante a estação fria.

Quanto à preferência das várias espécies animais pelos diferentes tratamentos nas três estações do ano, verificou-se uma interacção significativa (Quadro I). Pereira *et al.* (2000)

também tinham verificado diferenças de difícil explicação, na preferência por diferentes tipos de melhoramento de pastagem pelas diferentes espécies animais consoante a época do ano.

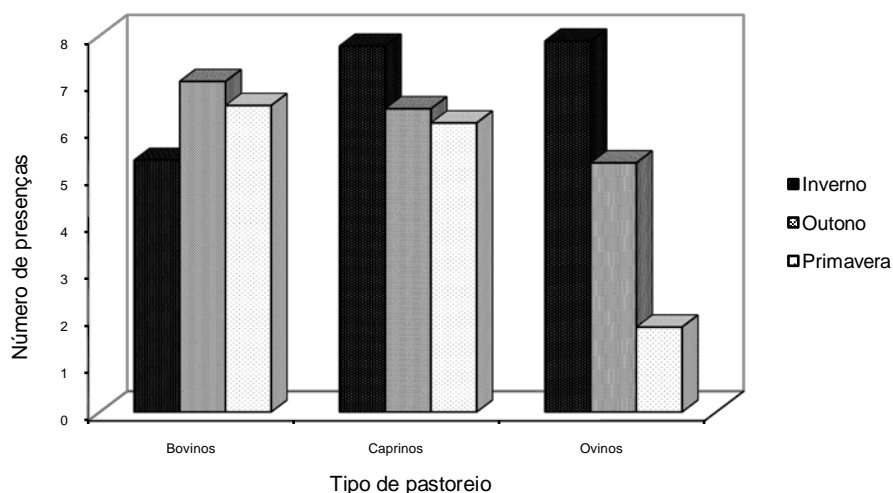


Figura 4 - Presença em pastoreio (dia) de cada espécie nas diferentes épocas do ano.

## CONCLUSÕES

O comportamento dos animais em pastoreio foi influenciado pelo tratamento, pastoreio, estação do ano e ano. O tratamento preferido pelos animais foi o T4 (sementeira com mobilização, fertilização e calagem). A espécie que despendeu menos tempo em pastoreio foi a ovina e, principalmente, na Primavera. Todos os animais pastorearam menos durante a Primavera, reflectindo uma melhor qualidade e maior quantidade da pastagem.

## BIBLIOGRAFIA

- Araujo Filho, J.A. e Crispim, S.M.A., 2002. Pastoreio combinado de Bovinos, caprinos e ovinos em áreas de Caatinga no Nordeste do Brasil In I Conferência Virtual Global sobre produção orgânica de bovinos de corte, University of Contestado, Brazil.
- Marques, M.R. e BELO, C.C., 2001. Estudo do comportamento alimentar de ovelhas serra da estrela em condições de pastoreio diferido/rotacional. Influência da suplementação

energética da erva na quantidade e qualidade do leite produzido. *Pastagens e Forragens*, 22: 19 - 36.

Pereira, E.A., Babo, H.C.O., e Potes, J.M., 2000. Estudo da interacção animal/pastagem em pastagens melhoradas em montado de azinho. In: III Reunião Ibérica de Pastagens e Forragens. pp 535 - 541.

Potes, J.M., e Babo, H.C.O., 2003. Montado, an old system in the new millennium; *African Rangeland Forage Science*, 20 (2): 131 - 146.

Santos, J.C., Pinheiro, R.A.G. e Barros, M.N.M., 2001. Bovinos em pastoreio na Serra da Peneda – Estudo da estratégia alimentar, *Pastagens e Forragens*, 22: 55 - 69.



## POTENTIAL OF USE OF THE EVAPORATIVE COOLING IN THE MILK BOVINOCULTURA DURING PERIODS OF THERMAL STRESS IN THE ALENTEJO

M. PERISSINOTTO<sup>1</sup>, V. FITAS DA CRUZ<sup>2</sup>, E. LUCAS<sup>2</sup> e D. J. DE MOURA<sup>3</sup>

1 Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Dep de Engenharia Rural. Av. Pádua Dias, 11 CP. 09 CEP: 13418-900, Piracicaba, São Paulo e ICAM – Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, mperissi@esalq.usp.br; 2 Universidade de Évora, Departamento de Engenharia Rural e ICAM – Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Apartado 94, 7002-554, Évora, Portugal, vfc@uevora.pt; 3 Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola. Cidade Universitária “Zefferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, CP: 6011, Cep: 13083970, Campinas, São Paulo; daniella.moura@agr.unicamp.br

(Recepção: 20 de Junho de 2006; Aprovação: 5 de Outubro de 2006)

### ABSTRACT

The aim of this research was to verify the potential of evaporative cooling systems utilization in dairy production. The effect of those systems in the Temperature Humidity Index was analyzed during periods of thermal stress conditions (high environment temperatures and low humidity levels) in Alentejo zone. Climatic data concerning to the years 2001 until 2004 were collected at the weather station located in Mitra Farm. This station is operated by CGE (Évora Geophysics Research Center) and by ICAM (Mediterranean Agrarian Sciences Institute). THI was calculated according with the equation:  $THI = 0.72T_{bu} + 0.72T_{bs} + 40.6$ . An efficiency of 80% for the evaporative cooling systems (evaporative pads) was considered. The THI values were classified in 3 classes (alert, danger and emergency). The climatic data show that in Alentejo zone there are large periods of thermal stress conditions for dairy cows. The results evidence the benefit effects of use of evaporative cooling systems in the reduction of those thermal stress periods. Those systems enable the decrease of the daily maximum THI, mainly in the danger and emergency THI classes.

**Key words:** dairy cattle, temperature and humidity index, thermal stress

## POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DO ARREFECIMENTO EVAPORATIVO NA BOVINOCULTURA LEITEIRA DURANTE PERÍODOS DE STRESS TÉRMICO NO ALENTEJO

### RESUMO

O presente trabalho teve como objectivo analisar o potencial da utilização do sistema de arrefecimento evaporativo do ar na bovinocultura leiteira analisando seu efeito no Índice de

Temperatura e Humidade (THI) durante períodos de *stress* térmico em regiões no Alentejo caracterizadas por altas temperaturas e baixa humidade relativa do ar. Para a análise física do ambiente utilizaram-se os dados climáticos diários do período de 2001 a 2004 obtidos pela base de dados sob a responsabilidade do Centro de Geofísica de Évora (CGE) em colaboração com o Instituto de Ciências Agrárias e Mediterrânicas (ICAM), sendo a estação situada na Herdade da Mitra - Valverde. Estes dados foram utilizados para o cálculo do THI de acordo com a equação:  $THI = 0,72 T_{bu} + 0,72 T_{bs} + 40,6$ . A eficiência utilizada para o sistema de arrefecimento evaporativo (painéis evaporativos) foi de 80%. Verificou-se que devido às características climáticas da região estudada, apresentando períodos de *stress* térmico com altas temperaturas associadas com baixa humidade relativa do ar, e devido à grande influência negativa dessa condição climática na produção dos bovinos leiteiros, se justifica a utilização de um sistema de arrefecimento evaporativo do ar. Este sistema possibilitará um decréscimo significativo do THI máximo diário, principalmente nas classes de THI classificadas como de perigo e emergência.

**Palavras-chave:** bovinocultura leiteira, índice de temperatura e humidade, *stress* térmico

## INTRODUÇÃO

Sistemas de condicionamento do ar baseados no processo de arrefecimento evaporativo constituem uma alternativa de baixo consumo de energia e livre de poluição, adequada para a manutenção de conforto térmico em grandes espaços. A principal característica do arrefecimento evaporativo é que sua eficiência aumenta quanto mais quente e seco for o ar, sendo assim especialmente adequados para regiões de clima quente e seco.

Um sistema de arrefecimento evaporativo directo consiste basicamente de um painel evaporativo, bomba de água, recipiente, ventilador e borrifador. Com o sistema em funcionamento, a água é borrifada da parte superior do sistema a fim de criar uma película de água em queda por gravidade sobre a superfície do painel. Por acção do ventilador, uma corrente de ar passa através do painel húmido, tornando-se mais frio e húmido devido à transferência de calor e massa entre a película de água e o ar. No fim do processo, o ar sai do painel com sua temperatura de bolbo seco menor e humidade relativa maior, enquanto que a água é recolhida num recipiente localizado na parte inferior, sendo recirculada continuamente por meio de uma bomba de água. Deste modo, a temperatura da água aproxima-se da temperatura de bolbo húmido ambiente (Castro e Pimenta, 2004).

A redução de temperatura será tanto maior quanto menor for a humidade relativa do ar captado. Assim sendo, para uma mesma temperatura na entrada do refrigerador, podemos ter diferentes temperaturas na saída conforme varie a humidade relativa do ar na entrada. Um facto muito importante a ter em consideração é que a humidade relativa varia ao longo de um dia normal. Tendo em vista que a humidade absoluta (gramas de vapor de água/kg ar

seco) não se altera muito ao longo do dia, a menos que ocorram chuvas ou se esteja próximo a regiões cobertas por água (mar, rios, represas, etc.), a humidade relativa vai variar inversamente com a temperatura. Assim, quanto mais quente o período do dia, menor a humidade relativa e melhor o desempenho do arrefecimento evaporativo.

Para caracterizar ou quantificar as zonas de conforto térmico adequadas às diferentes espécies animais foram desenvolvidos índices de conforto térmico, os quais apresentam numa única variável, vários factores que caracterizam o ambiente térmico que circunda o animal. No desenvolvimento de um índice de conforto térmico tomam-se em conta os factores meteorológicos relevantes para a criação de certo animal e ressalta-se o peso que cada factor possui dentro desse índice, conforme sua importância relativa. O Índice de Temperatura e Humidade (THI ou ITU), foi desenvolvido, inicialmente, para humanos, mas observou-se que as mesmas variáveis psicrométricas causadoras do desconforto térmico em humanos também causam certo desconforto em vacas leiteiras, o que pode acarretar decréscimos na produção de leite. Este índice de conforto é o mais comum, sendo desenvolvido originalmente por Thom (1959), e é utilizado para estabelecer classes que são definidas de acordo com a reacção fisiológica e/ou comportamental do animal. Quando o animal se encontra dentro de uma faixa de THI considerada adequada, ele desempenhará suas funções produtivas de forma optimizada. Esta faixa pode variar em função da raça, fase de lactação e idade do animal. De acordo com Du Preez *et al.* (1990), depois de amplos estudos, as classes de THI para vacas Holstein-Frisian podem ser estabelecidas da seguinte forma: menor ou igual a 70, normal; de 71 a 72, alerta; 73 a 78, alerta e acima do índice crítico para a produção de leite (perda); 79 a 82, perigo; e acima de 82, emergência.

Este estudo teve como objectivo analisar o potencial da utilização do sistema de arrefecimento evaporativo do ar na bovinocultura leiteira analisando seu efeito no THI durante períodos de *stress* térmico em regiões no Alentejo caracterizadas por altas temperaturas e baixa humidade relativa do ar.

## METODOLOGIA

Para a análise física do ambiente utilizaram-se os dados diários da temperatura de bolbo seco máxima e da temperatura de bolbo húmido do período de 2001 a 2004, obtidos pela base de dados sob a responsabilidade do Centro de Geofísica de Évora (CGE) em colaboração com o Instituto de Ciências Agrárias e Mediterrânicas (ICAM). A estação

meteorológica situa-se na Herdade da Mitra – Valverde, que se encontra na latitude 38º60'N e longitude 7º54'W, estando localizada a cerca de 30m de altitude.

Com os dados obtidos calculou-se o THI máximo diário, de acordo com a seguinte equação (NWSCR, 1976):

$$THI = 0,72 Tbu + 0,72 Tbs + 40,6$$

onde: Tbu = Temperatura do termómetro de bolbo húmido (°C) e Tbs = Temperatura do termómetro de bolbo seco (°C). O sistema de arrefecimento utilizado neste estudo foi o sistema de painéis evaporativos. De acordo com Lucas *et al.* (2000) a eficiência deste sistema de arrefecimento, para as condições climáticas em que se processou este estudo é de cerca de 80%. Este foi o valor utilizado para a determinação da temperatura de bolbo seco do ar arrefecido, que por sua vez foi utilizado para a determinação do THI do ar após o arrefecimento. De acordo com Heber *et al.*, (1991), Koca *et al.*, (1991) e Al-Massoum *et al.* (1998), a eficiência a ser considerada no dimensionamento e manejo do sistema de arrefecimento evaporativo, é estimada pela seguinte equação:

$$\eta_c = [(Tbs - Tc) / (Tbs - Tbu)] * 100,$$

em que:  $\eta_c$  é a eficiência de arrefecimento do sistema (%); Tbs e Tbu são a temperatura de bolbo seco e a temperatura de bolbo húmido do ar exterior (°C) e Tc é a temperatura de bolbo seco (°C) do ar arrefecido.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadro I mostra o número de dias com THI máximo diário nas classes de alerta com perda ( $72 \leq THI \leq 78$ ), perigo ( $79 \leq THI \leq 82$ ) e emergência ( $THI > 82$ ), para vacas Holstein-Frisian, de acordo com Du Preez *et al.* (1990), antes (Ambiente Normal) e após a aplicação teórica do arrefecimento evaporativo.

Devido ao decréscimo da temperatura de bolbo seco e ao aumento da humidade relativa observam-se resultados benéficos, com decréscimo do THI máximo diário, principalmente nas classes de perigo e emergência. Com a utilização teórica do sistema de arrefecimento evaporativo é possível observar uma redução de aproximadamente 78% dos dias com THI máximo na classe de perigo nos anos de 2002, 2003 e 2004 e uma diminuição de cerca de 95% dos dias com THI máximo inserido na classe de emergência nos anos de 2001, 2002 e 2004, quando comparado com o ambiente sem arrefecimento. A classe de alerta com

perda da produção dos bovinos leiteiros mostra resultados menos expressivos do que as outras classes analisadas da utilização do sistema de arrefecimento evaporativo do ar, com redução de 21% dos dias com THI máximo nessa faixa de THI nos anos de 2001 e 2002, quando comparado com o ambiente sem arrefecimento. No ano 2004 regista um incremento com a utilização do sistema de arrefecimento evaporativo. No entanto tal não se deve a um aumento dos número de dias que estavam em situação normal e que passaram para esta situação, mas sim a uma transferência do número de dias que estavam em situações mais prejudiciais (perigo e emergência) para esta situação.

QUADRO I - NÚMERO DE DIAS COM THI MÁXIMO DIÁRIO NAS CLASSES DE ALERTA COM PERDA, PERIGO E EMERGÊNCIA, PARA VACAS HOLSTEIN- FRISIAN, ANTES E APÓS A APLICAÇÃO TEÓRICA DO ARREFECIMENTO EVAPORATIVO, ASSUMINDO A EFICIÊNCIA DE ARREFECIMENTO DE 80%

Ano	Alerta com perda (72 – 78)		Perigo (79 – 82)		Emergência (> 82)	
	Ambiente	Arrefecimento	Ambiente	Arrefecimento	Ambiente	Arrefecimento
	Normal	Evaporativo	Normal	Evaporativo	Normal	Evaporativo
2001	66	52	25	15	44	2
2002	72	57	45	9	22	1
2003	58	54	48	11	31	14
2004	50	69	50	12	33	2
Total	246	232	168	47	130	19

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Lucas *et al.* (2000), para suínos, que com a utilização do arrefecimento evaporativo, conseguiram reduzir a duração do número de horas com o Índice de Temperatura e Humidade na classe de alerta e até mesmo eliminar, nalgumas regiões do Alentejo, o número de horas com THI nas classe de perigo e emergência, no período de 1995 a 1997. Segundo estes autores a frequente ocorrência de altas temperaturas associadas com baixa humidade relativa em períodos de *stress* térmico na região do Alentejo, justifica a utilização do arrefecimento evaporativo.

Vários trabalhos realizados nos Estados Unidos, em regiões mais quentes e secas, mostram que o decréscimo na temperatura do ar por via evaporativa, em instalações mais fechadas, pode chegar a 12 °C (Wiersma e Stott, 1983). Em instalações abertas no Brasil (Tinôco, 1996) verificou decréscimos de 6 °C na temperatura do ar, em condições de Verão. Em nenhum dos estudos referidos a humidade relativa do ar alcançou valores demasiado elevados.

## CONCLUSÕES

Verificou-se que devido às características climáticas da região estudada, apresentando períodos de *stress* térmico com altas temperaturas associadas com baixa humidade relativa do ar, e devido à grande influência negativa dessa condição climática na produção dos bovinos leiteiros, se justifica a utilização de um sistema de arrefecimento evaporativo do ar. Este sistema possibilitará um decréscimo significativo do THI máximo diário, principalmente nas classes de THI classificadas como de perigo e emergência.

## BIBLIOGRAFIA

- Al-Massoum, A., Haffar, I. e Ahmed, M.H., 1998. A similitude model for testing greenhouse evaporative cooling pads under hot-arid conditions of UAE. *Acta Horticulturae*, 456: 329 - 337.
- Castro, W.P. e Pimenta, J.M.D., 2004. Modelagem e simulação de painéis evaporativos diretos. *Proc. of the 10<sup>th</sup> Brazilian Congress of Thermal Sciences and Engineering, ENCIT 2004. Braz. Soc. of Mechanical Sciences and Engineering, ABCM, Rio de Janeiro, Brazil, Nov. 29 Dec. 03.*
- Du Preez, J.D., Giesecke, W.H., Hattingh, P.J. e Eisenberg, B.E., 1990. Heat stress in dairy cattle and other livestock under Southern African conditions. II Identification of areas of potential heat stress during summer by means of observed true and predicted temperature-humidity index values. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 57: 183 - 187.
- Heber A., Cole S. e Murphy, J., 1991. Facility for testing exhaust ventilation fans. *Appl. Engineer. Agric.*, 7: 599 - 605.
- Koca R., Hughes, W. e Christianson, L., 1991. Evaporative cooling pads – test procedures and evaluation. *Appl. Engineer. Agric.*, 7: 485 - 490.
- Lucas, E.M, Randall, J.M e Meneses, J.F., 2000. Potential for evaporative cooling during heat stress periods in pig production in Portugal (Alentejo). *J. Agric. Eng. Res.* 76: 363 - 371.
- NWSCR, 1976. Livestock hot weather stress. Regional operations manual letter C-31-76. National Service Central Region, USA.
- Thom, E.C., 1959. The discomfort index. *Weatherwise*, Washington, 12 (2): 57 - 60.
- Tinôco, I. de F.F., 1996. Efeito de diferentes sistemas de condicionamento de ambiente e níveis de energia metabolizável na dieta sobre o desempenho de matrizes de frangos de corte, em condições de Verão e Outono. Tese de Doutorado em Ciência Animal, Nutrição, Bioclimatologia e Ambiente Animal. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 173 p.
- Wiersma, F. e Stott, G.H., 1983. Evaporative cooling. In: Hellickson, M.A.; Walker, J.N. (Ed.) *Ventilation of Agricultural Structures*, 2. Edgard Blucher. ST. Joseph, Michigan: ASAE, pp. 103-108.