

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA INSENSIBILIZAÇÃO DE
BOVINOS PARA O ABATE COM USO DE PISTOLAS
PNEUMÁTICAS DE DARDO CATIVO**

Steffan Edward Octávio Oliveira

Zootecnista

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA INSENSIBILIZAÇÃO DE
BOVINOS PARA O ABATE COM USO DE PISTOLAS
PNEUMÁTICAS DE DARDO CATIVO**

Steffan Edward Octávio Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Zootecnia**

2017

Oliveira, Steffan Edward Octávio

O48a Avaliação da eficiência da insensibilização de bovinos para o abate com uso de pistolas pneumáticas de dardo cativo/ Steffan Edward Octávio Oliveira. -- Jaboticabal, 2017

vii, 70 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa

Banca examinadora: Osmar Antonio Dalla Costa, Paola Moretti Rueda, Troy John Gibson, Janaína da Silva Braga

Bibliografia

1. Bovinos-abate 2. Pressão de ar. 3. Velocidade do dardo. 4. Consciência. 5. Respiração rítmica 6. Disparo I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.033:636.2


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA INSENSIBILIZAÇÃO DE BOVINOS PARA O ABATE COM USO DE PISTOLAS PNEUMÁTICAS DE DARDO CATIVO


AUTOR: STEFFAN EDWARD OCTÁVIO OLIVEIRA

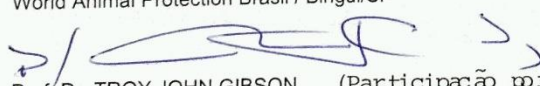
ORIENTADOR: MATEUS JOSÉ RODRIGUES PARANHOS DA COSTA

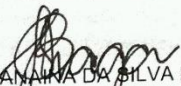
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MATEUS JOSÉ RODRIGUES PARANHOS DA COSTA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisador Dr. OSMAR ANTONIO DALLA COSTA (Participação por Videoconferência)
Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves / EMBRAPA - Concórdia/SC


Profa. Dra. PAOLA MORETTI RUEDA
World Animal Protection Brasil / Birigui/SP


Prof. Dr. TROY JOHN GIBSON (Participação por Videoconferência)
Royal Veterinary College / University of London/UK


Dra. JANAINA DA SILVA BRAGA
BEA Consultoria / Uberaba/MG

Jaboticabal, 31 de março de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Steffan Edward Octávio Oliveira nasceu na cidade de Mossoró, no estado do Rio Grande do Norte, no dia 1 de maio de 1985. No ano de 2004 ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Durante a graduação foi integrante do NUBEA (Núcleo de Pesquisa em Bem-Estar Animal e Ambiência), onde colaborou em pesquisas e participou de estágios e congressos. Em 2009 participou de um programa internacional de trainee com duração de um ano pela Universidade de Minnesota-EUA. Concluindo o curso no ano de 2010. Em 2011 Ingressou no mestrado em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal-SP, e foi bolsista da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). Durante o mestrado atuou na área de Bioclimatologia animal, com enfoque em bovinocultura de leite. Em maio de 2013 aprovou um projeto para contemplação de uma Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior e participou de um estágio na Universidade de Edimburgo- Escócia. No ano de 2014 ingressou no doutorado em Zootecnia na FCAV/Unesp, como integrante do Grupo ETCO, onde desenvolveu pesquisas na área de insensibilização de bovinos para o abate.

“Existem muitas hipóteses na ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura *de que necessitamos* para achar as que estão corretas”.

Carl Sagan

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	4
2.1. Métodos mecânicos de insensibilização	4
2.2. Dardo cativo penetrante X não-penetrante	4
2.3. O que se entende por morte?	7
2.4. Consciência e inconsciência	8
2.5. Estruturas cerebrais envolvidas na consciência	9
2.6. Indicadores de consciência e inconsciência	10
2.6.1. Postura em pé	11
2.6.2. Reflexo de endireitamento	12
2.6.3. Vocalização	12
2.6.4. Piscar os olhos espontaneamente	13
2.6.5. Movimentos de perseguição ocular	13
2.6.6. Resposta ao teste de ameaça	14
2.6.7. Ausência de respiração rítmica	15
2.6.8. Ausência de reflexo ocular	16
2.6.9. Indicadores com baixo poder discriminativo ou que necessitam de mais estudos	19
2.6.9.1. Tônus muscular	19
2.6.9.2. Rotação do globo ocular	20
2.6.9.3. Nistagmo	20
2.6.9.4. Resposta a estímulos dolorosos	21
2.6.9.5. Movimentos aparentemente espontâneos do pescoço ou patas após atordoamento	22

3. Referências bibliográficas	24
CAPÍTULO 2 – Efficiency of low versus high airline pressure in stunning cattle with a pneumatically powered penetrating captive bolt gun	
Abstract	32
1. Introduction	33
2. Materials and Methods	34
2.1. Abattoirs description	35
2.2 . Animals and airline pressures	35
2.3. Assessment of physical signals of brain function	35
2.4. Bolt velocity measurements and determination of physical parameters	36
2.5. Statistical analysis	37
3. Results.....	38
3.1. Physical signals of brain function	38
3.2. Shooting accuracy	39
3.3. Bolt physical parameters	40
4. Discussion	41
5. Conclusions	44
6. References	44
CAPÍTULO 3 – Effects of high airline pressures in stunning cattle with pneumatically powered penetrating and non-penetrating captive bolt guns	
Abstract	47
1. Introduction	48
2. Materials and Methods	49
2.1. Abattoirs description	49
2.2. Animals and airline pressures	49
2.3. Assessment of physical signals of brain function	50
2.4. Bolt velocity measurements and determination of physical parameters	50
2.5. Statistical analysis	51

3. Results	51
3.1. Physical signals of brain function	51
3.2. Shooting accuracy	52
3.3. Bolt physical parameters	53
4. Discussion	54
5. Conclusion	56
6. References	57
CAPÍTULO 4 – Evaluation of brain damage resulting from penetrating and non– penetrating stunning of Nelore Cattle using pneumatically powered captive bolt guns ..	59
Abstract	59
1. Introduction	59
2. Materials and Methods	61
3. Results	62
4. Discussion	65
5. Conclusion	68
6. References	69
CAPÍTULO 5 – Final considerations	71



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 022754/14 do trabalho de pesquisa intitulado "Avaliação da eficiência da insensibilização de bovinos para o abate com uso de pistolas pneumáticas de dardo cativo", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 01 de dezembro de 2014.

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Prevalence of physical signs of brain function in cattle after being shot with pneumatic penetrating captive bolt gun at low airline pressure (LP = 160-175 psi) and high airline pressure (HP = 190 psi) assessed on the ground, just after the animal had rolled out of the stunning pen (GR), just after being hoisted (HO), and at the bleeding rail (BL).....	39
Tabela 2 - Frequency of shots at the ideal shooting position in cattle heads and the deviation in cm from that position, when shot with pneumatically powered penetrating captive bolt guns operating with low (LP = 160-175 psi) and high (HP = 190 psi) airline pressure.....	40
Tabela 3 - Mean values (\pm SD) of recorded bolt velocity and calculated values of momentum, kinetic energy and energy density according to the airline pressure.....	40
Tabela 4 - Prevalence of physical signs of brain function in cattle after being shot with pneumatic non-penetrating captive bolt gun (NPCB, 210-220 psi) and penetrating captive bolt gun (PCB, 190 psi) assessed on the ground, just after the animal had rolled out of the stunning pen (GR), just after being hoisted (HO), and at the bleeding rail (BL).....	52
Tabela 5 - Frequency of shots at the ideal shooting position in cattle heads and the deviation in cm from that position, when shot with pneumatically powered non-penetrating captive bolt gun (NPCB, 210-220 psi) and with pneumatic penetrating captive bolt gun (PCB, 190	

psi).....	53
Tabela 6 - Mean values (\pm SD) of recorded bolt velocity and calculated values of momentum, kinetic energy, energy density and sectional density according to the stunning method.....	53
Tabela 7 - Means \pm SD of skin and bone thickness, bolt penetration angle, bolt penetration depth and hemorrhage over the left and right hemisphere of the brain according to method of stunning and airline pressure.....	62
Tabela 8 - Absolute and relative frequencies of cattle with hemorrhage and laceration according to the brain structures during post mortem examination in function of the stunning method and airline pressure.....	65
Tabela 9 - Hemorrhage and laceration observed in the brainstem structures during post mortem examination according to method of stunning and airline pressure.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Bolt velocity profile through the velocity meter according to the airline pressure.....	41
Figura 2 - Bolt velocity profile according to gun type.....	54
Figura 3 - Adult male Nelore cattle: Shot that failed to reach the brain when shooting with PCB gun operating with 160 psi (1a). Ventral and superior aspect of the brain showing frontal lobe laceration when shot with PCB gun operating with 160 psi (1b and 1c). Right cerebral hemisphere showing abundant subarachnoid hemorrhage around the brainstem when shot with PCB gun operating with 190 psi (1d). Protractor inserted into the bolt wound cavity in the right cerebral hemisphere highlighting laceration reaching the hypothalamus of a head shot with PCB gun operating with 190 psi (1e).....	64
Figura 4 - Radiographic images of adult male Nelore cattle shot with pneumatically powered penetrating captive bolt gun with infusion of 5 to 10 ml of barium to produce contrast through the bolt cavity: Cattle shot with PCB gun operating with 160 and 175 psi showing a very shallow bolt penetration depth (2a and 2b, respectively). Greater penetration depth caused by PCB operating with 190 psi (2c and 2d).....	67

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne bovina do mundo e, em 2013, foi responsável por mais de 20% do comércio mundial, exportando 18,5% das 9,67 milhões de toneladas de carne bovina produzidas ao longo do ano (USDA-FAS, 2014). No entanto, a preservação desta posição está sujeita à continuidade das inovações científicas e tecnológicas em todos os setores da cadeia, as quais são responsáveis pela manutenção dos padrões de qualidade (FERRAZ & FELICIO, 2010). Além disto, existe ainda uma preocupação ética e moral dos países consumidores como Japão, Estados Unidos e a comunidade europeia com os métodos utilizados para o abate destes animais.

Desta maneira, a tendência é que o mercado de carne se torne cada vez mais exigente quanto a certificação de que os animais foram abatidos de acordo com os métodos humanitários, o que, segundo a Instrução Normativa 17, Nº 3, de 17 de Janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000), é definido como um conjunto de diretrizes técnicas e científicas que garantem o bem-estar dos animais desde a recepção, insensibilização até o momento da sangria.

A insensibilização é considerada a etapa mais crítica do abate de bovinos (ROÇA, 2002), cujo objetivo principal é o de promover a rápida inconsciência do animal, estado esse que deve ser assegurado até o momento da sangria, minimizando a dor e o sofrimento dos animais (GREGORY, 1998).

O uso de pistolas de dardo cativo para insensibilização de bovinos é o método de eutanásia mais comum em abatedouros (FINNIE 1997), o qual pode ser realizado por meio de mecanismos penetrantes ou não-penetrantes (BLACKMORE e DELANEY, 1988). Os princípios básicos por trás de sua operação são os mesmos para ambos os métodos e envolvem a transferência de energia cinética do dardo para o cérebro (FAROUK, 2013). No entanto, há diferenças em relação a como esses métodos devem insensibilizar o animal.

Pistolas de dardo cativo não-penetrante causa rápida aceleração angular da cabeça após o impacto de um dardo mais largo contra o crânio do animal. As forças de aceleração/desaceleração proporcionam elevados valores de força cinética (*momentum*), de rotação e de cisalhamento à cabeça e ao cérebro, mas a energia cinética transmitida ao cérebro é relativamente baixa (OMMAYA et al., 2002). Nos quadrúpedes, os eixos do cérebro e da medula espinhal são paralelos. Este *neuraxis* quase linear pode impedir a ação de forças rotacionais após o atordoamento com dardo cativo não-penetrante e tornar o animal muito menos vulnerável à concussão (FINNIE, 2001). Além disso, o cérebro destes animais é melhor protegido do que o dos humanos por músculos temporais bem desenvolvidos e grandes seios frontais (SUMMER et al., 1995).

Em contrapartida, com o dardo cativo penetrante, o movimento da cabeça é reduzido, o que se deve à menor área da cabeça atingida por um dardo de menor diâmetro, fornecendo alta energia cinética focal e baixa força cinética contra o crânio (OMMAYA et al., 2002). A intenção é induzir uma forma profunda e irreversível de concussão (GREGORY et al., 2007), uma vez que há destruição de tecido cerebral na cavidade permanente produzida pelo dardo, a qual é circundada por uma zona hemorrágica (FINNIE, 2016).

A avaliação da eficiência do atordoamento é geralmente feita por meio da observação de comportamentos e sinais físicos que indiquem a *profundidade* da concussão (função cerebral), como, por exemplo, o colapso imediato do animal após o disparo (TERLOUW et al., 2016), ausência de reflexo de córnea (STURGES, 2005) e ausência de respiração rítmica (GREGORY, 2007). A combinação destes e outros indicadores pode confirmar ou não o estado de insensibilidade do animal.

Como afirmado por Gibson et al. (2015), a insensibilidade é causada por uma combinação de danos diretos ao cérebro e pela quantidade de energia cinética transmitida à cabeça do animal. A energia cinética transmitida através do dardo depende da sua massa e é diretamente proporcional ao quadrado de sua velocidade. Dörfler et al. (2014) observaram que ao disparar com pistolas de dardo cativo acionados por cartucho de explosão, apenas um terço ou no máximo

metade da energia potencial do cartucho é transformado em energia cinética do dardo (uma vez que parte de sua energia potencial é provavelmente desperdiçada como energia térmica quando o cartucho é disparado).

Por outro lado, pistolas pneumáticas usam ar comprimido como energia potencial quando a arma é disparada, o que evita que a energia seja desperdiçada em forma de calor, tal como ocorre com pistolas acionadas por cartuchos. Assim, o nível de pressão de ar na câmara de ar destas pistolas antes do disparo pode afetar a velocidade do dardo, a quantidade de energia cinética transmitida à cabeça do animal e, conseqüentemente, a eficiência do atordoamento.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência dos métodos penetrativo e não-penetrativo de insensibilização de bovinos para o abate com o uso de pistolas pneumáticas de dardo cativo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Métodos mecânicos de insensibilização

A insensibilização por meio de dardo cativo é o método de eutanásia mais frequentemente usado em matadouros, e seus consequentes danos cerebrais devem ser suficientes para tornar os animais inconscientes o mais rápido possível. Tanto as pistolas de dardo cativo penetrante quanto não-penetrante são usadas nos métodos mecânicos de insensibilização (FINNIE et al., 2000).

Os mecanismos que causam lesões cerebrais diferem em muitos aspectos, principalmente quando são projetados para penetrarem ou não a cabeça durante o atordoamento. No método não penetrante, as forças de aceleração/desaceleração proporcionam grande força cinética (*momentum*), de rotação e de cisalhamento à cabeça e ao cérebro, mas a energia cinética é relativamente baixa (KE). Em contrapartida, o método penetrante fornece uma KE focal e elevada, mas produz força cinética relativamente baixa (OMMAYA et al., 2002).

2.2. Dardo cativo penetrante X não-penetrante

Quando pistolas com dardo cativo penetrante são usadas o intuito é produzir um estado de inconsciência instantâneo, o qual deve-se a lesão irreversível no cérebro, causada pela penetração do dardo através do crânio (GREGORY, 2007). As sequelas clínicas causadas por disparos de projéteis livres ou por dardo cativo na cabeça são, em grande parte, determinadas pelo curso do projétil através do crânio e do cérebro e da energia liberada em seu interior (DIMAIO, 1999).

O dano cerebral infligido por dardo cativo é em grande parte determinado pela quantidade de KE depositada no cérebro por um dardo que perde velocidade à medida que penetra. A KE transferida para o cérebro por um dardo é igual a $0,5 \times \text{massa do dardo} \times (\text{velocidade do dardo})^2$ (DIMAIO, 1999). Conseqüentemente, o dano cerebral resultante é uma função da massa do dardo e, mais particularmente, da sua velocidade. Desta forma, todos os objetos em movimento têm KE, e quando um projétil entra no cérebro toda essa energia é dissipada. Isso

ocorre através da transmissão de movimento aos tecidos e fluidos, fraturando ossos, vaporizando líquidos e gerando calor à medida que o dardo perde velocidade. Como antes de ser retraído o dardo fica retido dentro do cérebro (embora por um breve intervalo), toda a sua energia é depositada no tecido neural (CAREY, 1996). Para uma insensibilização eficiente de bovinos, há vantagens consideráveis na dissipação de KE do dardo dentro da cavidade craniana, sem penetração dos ossos contralaterais do crânio, afim de aumentar a gravidade dos danos cerebrais. O contrário caracterizaria *perfuração*, com uma pequena cavidade de entrada e uma grande de saída, com considerável desperdício de KE fora da cavidade craniana.

Existem vários mecanismos pelos quais um dardo cativo penetrante lesiona o cérebro. Inicialmente, uma onda de choque se move através do tecido neural à frente do dardo, um evento de curta duração e que isoladamente pode não ser muito prejudicial. Um trajeto (cavidade permanente pós penetração) é então produzido pelo dardo ao passar pelo cérebro, causando extensa laceração e esmagamento do parênquima (FACKLER, 1996).

O tamanho da cavidade permanente - que é sempre hemorrágica - depende do diâmetro do dardo, e é influenciada por qualquer instabilidade ou deformação do mesmo. Esta lesão é acentuada pela intrusão de fragmentos ósseos e porções de couro cabeludo lacerado e tecidos moles subjacentes. Nas cavidades permanentes produzidas nas regiões cérebro-corticais, os neurônios são totalmente destruídos, enquanto que aqueles em tecidos adjacentes são marcadamente alongados e deformados. Há também a formação de uma cavidade temporária por onde o dardo passa, cavidade esta preenchida por fluidos momentos após a lesão (ADAMS, 1968).

Quando um dardo passa através do cérebro, KE é transferida para o tecido contíguo, que é impulsionado radialmente a partir da cavidade formada por este, produzindo uma grande cavidade temporária. Esta cavidade temporária é a principal responsável pela fatalidade das lesões no cérebro, especialmente quando um projétil possui alta velocidade. O cérebro é muito sensível aos efeitos de alongamento causados pela cavitação produzida pelo dardo (e as grandes

pressões internas geradas nas suas paredes em expansão), uma vez que estas são relativamente inelásticas. Os tecidos inelásticos, como cérebro, fígado, baço e osso, são mais sensíveis aos efeitos da cavidade temporária do que os tecidos elásticos, como músculo, pulmão, pele e intestino, com danos ainda mais potenciados nas lesões cerebrais devido a inelasticidade do crânio (FACKLER, 1996).

Quando o limite de elasticidade do tecido neural é atingido, o tecido colapsa até o ponto a partir do qual foi originalmente deslocado. Este ciclo pode ser repetido várias vezes antes que o tecido corrompido se assente ao redor da cavidade permanente, aumentando o dano ao tecido. Estes movimentos oscilantes da cavidade propagam amplamente ondas de pressão pelo cérebro, resultando em distorção e danos nos vasos sanguíneos e fibras nervosas distantes da cavidade primária (OEMICHEN et al., 2004).

Microscopicamente, há destruição do tecido cerebral na cavidade permanente, que subseqüentemente colapsa ou é comprimido por um edema circundante. Esta cavidade permanente é rodeada por uma zona hemorrágica, cuja forma e extensão são determinadas pelo fornecimento de sangue à região lesada. Esta zona de hemorragia é, por sua vez, rodeada por uma zona de necrose, que envolve principalmente neurônios e axônios, e sua formação é secundária à cavitação temporária. Lesões axonais mais difundidas também ocorrem distante da cavidade permanente (SELLIER & KNEUBUEHL, 1994).

Comparativamente, lesões causadas por dardo cativo penetrante diferem daquelas causadas por dardo cativo não-penetrante. Com dardo cativo penetrante, as faces interna e externa do crânio são fraturadas, com subjacente contusão devido ao impacto. Por outro lado, o dardo cativo não-penetrante às vezes fratura apenas a face externa do crânio, embora contusões causadas pelo impacto sejam observadas frequentemente. Lesão focal e axonal é mais grave com uso do dardo cativo penetrante, enquanto o dano neural é mais amplamente distribuído após um impacto por dardo cativo não-penetrante. Este último causa rápida aceleração angular (rotacional) da cabeça após o impacto de um dardo mais largo e em forma de cogumelo contra o crânio do animal, enquanto a área da

cabeça impactada pelo dardo penetrante é menor e o movimento da cabeça é consequentemente reduzido (FINNIE, 1997).

No entanto, no único estudo (em ovinos) comparando os danos cerebrais causados por atordoamento com dardo cativo penetrante e não-penetrante, o grau de lesão geral e a combinação de lesão focal e difusa sugeriram que ambos os métodos são uma forma aceitável de eutanásia (FINNIE et al., 2000). Adicionalmente, o dano cerebral é influenciado pela região da cabeça onde ocorre o impacto (não-penetrante), sendo, em ovinos, maior quando ocorre no sentido frontal, seguido por occipital e temporal (FINNIE et al., 2001). Desta forma, concluiu-se que, tanto o método penetrante como não-penetrante, se aplicados corretamente, são capazes de deixar os animais em um estado de inconsciência antes da morte.

2.3. O que se entende por *morte*?

A perda da consciência é resultado de uma disfunção de certas áreas do cérebro que podem ser reversíveis ou irreversíveis. Isso não necessariamente implica que o indivíduo em questão esteja morto. Atualmente, à luz do conhecimento médico moderno, a maioria dos países definem morte em termos de morte cerebral e, na maioria destes, a definição concerne apenas à disfunção irreversível do tronco cerebral (LAUREYS, 2005). O que deveria ser incontestável, uma vez que esta estrutura é responsável por funções vitais, como respiração, termorregulação e ritmo cardíaco. Além disto, quando há perda total do funcionamento do tronco cerebral, uma grande parte do cérebro para de funcionar corretamente (WIJDICKS, 2001). Consequentemente, como não haverá fornecimento de oxigênio, o metabolismo do cérebro e a atividade cortical são completamente interrompidas (BERRÉ, & GOLDMAN, 2001). Diz-se, então, que o indivíduo está *morto*.

Alternativamente, a patologia forense (SAUKKO & KNIGHT, 2014) descreve dois tipos de morte: *Morte somática*, em que o indivíduo se torna irreversivelmente inconsciente, incapaz de se comunicar com o ambiente ao seu redor e de se manifestar contra qualquer estímulo sensorial ou realizar qualquer movimento

involuntário. Todavia, alguns reflexos nervosos podem persistir e suas funções circulatórias e respiratórias funcionam espontaneamente ou com a ajuda de aparelhos; e *Morte celular*, em que os tecidos e suas células constituintes estão mortas – ou seja, sem atividade metabólica. Isto ocorre devido a isquemia e anóxia, causadas por falha cardiovascular. Como o tecido nervoso é o mais sensível a falta de oxigênio, com o córtex cerebral sendo vulnerável a apenas poucos minutos de anóxia, (enquanto tecidos conectivos e músculos podem sobreviver a muitas horas e até dias após interrupção da circulação) a morte cerebral ocorre em poucos instantes.

2.4. Consciência e inconsciência

Consciência representa o mais alto nível de funcionamento cerebral e, devido a isto, tem se provado uma área bastante difícil de ser estudada com conclusões unânimes. Para Watson (2010), se quisermos discutir acerca da consciência precisamos primeiramente ser capazes de distinguir entre os estados de consciência e inconsciência, o que é bastante complicado. Por um lado, um indivíduo pode estar acordado, mas não completamente consciente, por outro, um nível limitado de consciência parece existir durante os sonhos, naqueles em que ocorre rápidos movimentos oculares (sono REM). Eventos como sonambulismo, pesadelos e narcolepsia em humanos têm demonstrado que até mesmo a relação entre consciência e sono é bastante complexa.

Uma teoria que se tornou uma das mais aceitas é a proposta por Bernard Baars décadas atrás (1938). Segundo Baars, não existe um centro da consciência no cérebro, e sim uma atividade coordenada de várias partes do córtex cerebral. Por exemplo, se áreas isoladas do córtex cerebral, como as responsáveis pela visão, tato e paladar apresentarem atividade, mas de maneira isolada, o estado de consciência não está presente. No entanto, se houver plena comunicação entre estas, pode-se dizer que o indivíduo em questão está, de alguma forma, consciente. Uma clara implicação da consciência é a *experiência mental da atividade do sistema nervoso*. De maneira mais simples, nós percebemos e

sentimos o ambiente que nos cerca à medida que este se torna acessível aos nossos sistemas sensoriais.

2.5. Estruturas cerebrais envolvidas na consciência

Se um animal é atordoado ou não antes de ser sangrado este perde a consciência antes de morrer (TERLOUW, 2016). Para entendermos o processo relacionados à perda da consciência de acordo com os métodos de abate empregados é necessário conhecer as implicações das diferentes estruturas do cérebro na consciência.

Como elucidado anteriormente, consciência é um conceito complexo. No entanto, dois componentes podem ser identificados (ZEMAN, 2005): em termos de nível de atenção (nível de consciência) e de percepção do ambiente e do estado interior do organismo em si (conteúdo da consciência) – alguns autores descrevem até oito tipos diferentes de consciência, partindo de sua elementaridade, ou seja, da percepção do universo que o cerca, até a consciência de que temos consciência.

O córtex cerebral ou estruturas periféricas dos hemisférios são primordiais nas funções neurológicas, incluindo autoconsciência (capacidade de perceber a si mesmo e distinguir-se do ambiente que o cerca), consciência dos estímulos externos (percepção do ambiente por meio dos sentidos) e dos estímulos internos relativos ao estado interno do organismo (ZEMAN, 2005). No contexto do abate, é mais relevante discutir mais detalhadamente a consciência da percepção do ambiente no qual o animal está inserido.

Partes diferentes do córtex são responsáveis por diferentes tipos de informações (ex. visual, auditivo ou informação somatossensorial) e possui diferentes funções. Os *córtices primários* estão envolvidos no processo de decifrar os sinais iniciais e na execução de movimentos. Os *córtices associativos* permitem a conceptualização da informação e sua integração em um contexto mais abrangente. Estes integram e interpretam a informação de áreas primárias e elabora respostas apropriadas. Portanto, a percepção consciente do ambiente requer bom funcionamento dos córtices primários e associativos, afim de

conhecer, entender e dar sentido àquilo que é percebido (CRICK & KOCH, 1995; LAUREYS, 2005).

O papel do córtex primário na percepção consciente é ilustrado pelo fenômeno conhecido como "*blind sight*", onde a cegueira resulta de uma lesão no córtex visual primário. Quando se pede a um indivíduo que sofreu tal lesão que indique se a forma apresentada é redonda, quadrada ou triangular, a pessoa "adivinha" a maior parte do tempo. Além do seu córtex visual primário, o sistema visual destes indivíduos é funcional, no entanto, a informação visual não atinge a consciência (DANCKERT & GOODALE, 2000). Existe também relatos deste fenômeno com outros sentidos, como audição e tato (STOERIG, 2007).

O papel dos córtices associativos na percepção consciente é ilustrado por casos de convulsões epiléticas que envolvem os córtices parietal e frontal associativo. Eles provocam um distanciamento do indivíduo durante o qual o paciente olha fixamente e não responde a estímulos (LAUREYS, 2005).

A *formação reticular* desempenha um papel essencial no nível de excitação. Ele está localizado no tronco cerebral e consiste em uma infinidade de redes neurais. A formação reticular e certas estruturas das protuberâncias dorsais projetam-se ao córtex e ativam-no permitindo que funcione corretamente. Estas projeções são chamadas de sistema de ativação reticular ascendente. Este sistema consiste em dois caminhos principais. Um passa através do tálamo, localizado logo acima do tronco cerebral, que por sua vez projeta-se sobre o córtex. A outra via funciona ventralmente através do hipotálamo - entre outros - antes de se projetar no córtex. Conseqüentemente, se uma lesão interrompe o funcionamento da formação reticular ou do sistema ativador reticular ascendente, o córtex não funciona ou funciona insuficientemente, causando inconsciência (BROWN et al., 2012).

2.6. Indicadores de consciência e inconsciência

Para evitar estresse ou dor desnecessários após o atordoamento, o estado inconsciente deve ser assegurado antes do animal ser içado (GRANDIN, 2013). Para isso, vários indicadores são usados para avaliar seu estado de consciência

ou inconsciência (EFSA, 2013). Estes *sinais clínicos* são indiretamente associados a funções cerebrais envolvidas na consciência, (particularmente a formação reticular e/ou o córtex cerebral), e alguns destes indicadores apresentam alta confiabilidade em demonstrar se determinado animal está consciente ou inconsciente. Para garantir o estado de inconsciência, os indicadores de consciência devem estar ausentes e os indicadores de inconsciência devem estar presentes – elementar.

A ausência ou presença desses indicadores deve ser verificada após o atordoamento e durante a sangria, tanto para abate convencional como religioso. Outros indicadores têm menor poder de discriminação e podem ser usados como informações complementares (GREGORY et al., 2007).

2.6.1. Postura em pé

No contexto do abate, a postura em pé é um indicador de consciência. Portanto, a perda imediata e permanente da postura em pé é usada como um indicador de uma potencial perda de consciência. O colapso imediato após o atordoamento é um dos principais indicadores, uma vez que é facilmente identificável. Além disto, este indicador permite avaliar a qualidade do atordoamento ou da hemorragia em animais não atordoados que são sangrados em pé (TERLOUW, 2016).

Este indicador deve ser interpretado com cautela, porque o colapso do animal pode ser causado por uma incapacidade de manter esta postura. Um exemplo disso ocorre quando um disparo é realizado de maneira incorreta e atinge o pescoço de um bovino, causando uma ruptura na medula espinhal superior, paralisando o animal sem danificar o cérebro. Além disso, é preciso maior atenção ao realizar esta avaliação em situações que restringem a cabeça ou corpo dos bovinos, pois o próprio mecanismo pode evitar que o animal colapse após o atordoamento (TERLOUW, 2016).

Após um atordoamento eficiente o animal irá colapsar imediatamente. Esse colapso pode ser explicado pelo dano à formação reticular, envolvido no controle da postura em pé (PURVES et al., 2001). A anóxia generalizada no cérebro após

o sangramento de animais não atordoados resulta também em uma disfunção progressiva global das estruturas corticais e subcorticais, o que explica a perda progressiva da capacidade de ficar em pé. Alguns autores sugerem que a perda da postura pode ser apenas um sinal dos estágios iniciais da inconsciência (GIBSON et al., 2015; GREGORY et al., 2010).

2.6.2. Reflexo de endireitamento

Um animal no chão que está consciente após um atordoamento malsucedido pode tentar levantar a cabeça e / ou o corpo, ou pelo menos posicioná-los no ângulo normal (eixo da cabeça/corpo perpendicular ao eixo da terra). Após um atordoamento eficiente, enquanto o animal está inconsciente, ele não tenta recuperar sua postura normal. Os movimentos de endireitamento são orientados, mas às vezes difíceis de distinguir de outros movimentos que são movimentos involuntários ou reflexos (ANIL, 1991). Desta forma, o reflexo de endireitamento é considerado indicativo de um retorno (parcial) da consciência e, portanto, de que o atordoamento não foi irreversível (GRANDIN, 2013). Vale salientar que este indicador não deve ser avaliado no momento da sangria, uma vez que os estímulos nociceptivos produzidos pelo corte provavelmente induz um reflexo de afastamento do pescoço e cabeça, o que se deve a mecanismos da medula espinhal (TERLOUW, 2015).

2.6.3. Vocalização

Em primeiro lugar, quando decidimos utilizar a vocalização como um indicador de consciência, devemos assegurar que este não possui função de comunicação social e, quando não, a vocalização expressa na maior parte das vezes dor e sofrimento (GRANDIN, 2013). Neste sentido, verificou-se que 99% das vocalizações de bovinos e suínos durante o abate foram precedidas de situações aversivas e dolorosas, como durante o uso de bastões elétricos, quedas, atordoamento ineficiente ou uso de pressão excessiva durante a contenção dos animais (GRANDIN, 1998; WATTS & STOOKEY, 2000).

Como a dor só pode ser percebida se o animal estiver consciente, vocalizações *intencionais*, que ocorrem após um atordoamento são indicativos de que o estado de consciência está presente (GRANDIN, 2013). No entanto, é preciso saber discernir vocalização dos sons guturais, os quais são produtos da passagem de ar pela traqueia, que ocorre, principalmente, devido à diferença de pressão quando o animal é içado de cabeça para baixo, produzindo um fenômeno acústico. Na língua inglesa este fenômeno é conhecido como “gasping”. St John (2009) define *gasping* como movimentos inspiratórios intermitentes, bastante vigorosos, que não estão organizados da mesma forma que a respiração normal e podem, também, ser induzidos por isquemia ou hipóxia.

2.6.4. Piscar os olhos espontaneamente

O piscar de olhos espontâneo envolve circuitos no tronco cerebral e no córtex, que são parcialmente os mesmos que os envolvidos no reflexo da córnea (BOUR et al., 2002; MORCUENDE et al., 2002). Piscar espontaneamente é considerado como um indicador de consciência (GRANDIN, 2013). Por exemplo, em um estudo envolvendo vinte touros, nenhum apresentou reflexo de córnea após o atordoamento, sugerindo um estado de inconsciência, porém três apresentaram piscar espontâneo (TERLOUW et al., 2015). Mais estudos são necessários para saber a relação exata deste indicador com o *nível* de consciência. A saber, quando evocamos uma resposta - por exemplo, pelo toque - estamos verificando a capacidade de núcleos específicos do cérebro de interpretar e responder a tal estímulo (tal como no reflexo de córnea). Entretanto, o piscar espontâneo pode estar relacionado a persistência de células nervosas nos nervos oculomotores (bovinos possuem pelo menos seis destes). Sendo assim, a ritmicidade e duração destes eventos devem ser considerados afim de entender melhor este indicador.

2.6.5. Movimentos de perseguição ocular

Os movimentos de perseguição ocular concernem aos movimentos dos olhos dirigidos a determinado estímulo dentro do campo visual do indivíduo. Após

um atordoamento mecânico eficiente, os olhos permanecem abertos, com as pálpebras e os globos oculares imóveis (GRANDIN, 2013). Desta forma, os movimentos de perseguição ocular são considerados um sinal de consciência porque envolvem não apenas estruturas diferentes no tronco cerebral, mas também no córtex (ENDERLE, 2000; TEHOVNIK et al., 2000).

Embora a presença de movimentos de perseguição ocular seja considerada indicativa da presença de consciência, a ausência de movimentos oculares não necessariamente indica inconsciência. Em um estudo, homens foram convidados a determinar os movimentos de um pêndulo enquanto uma pressão no pescoço foi exercida afim de interromper o fluxo sanguíneo até o cérebro. Como resultado os globos oculares permaneceram fixos no centro dos olhos cerca de um segundo antes da perda da consciência, como indicado pela presença de ondas delta no EEG. Questionados mais tarde, os sujeitos disseram que ainda estavam conscientes, mas incapazes de mover os olhos (ROSSEN et al., 1943).

2.6.6. Resposta ao teste de ameaça

Para testar a resposta a um estímulo de ameaça, um dedo, a mão ou um objeto específico é movido rapidamente em direção ao olho do animal e a presença de uma resposta intermitente ou reação de afastamento é verificada (LIMON et al., 2010; VERHOEVEN et al., 2015b). Para realizar o teste corretamente, deve ser verificado que o animal tem visão adequada (por exemplo, sem rotação do globo ocular ou nistagmo, sem sangue nos olhos). A resposta envolve mecanismos cerebrais de ordem superior (*high function*), incluindo funções corticais para integrar a informação proveniente do ambiente (LIU & RONTAL, 1992).

A relação entre o teste de ameaça e a consciência foi mostrada em ovinos e bezerros, uma vez que o reflexo foi perdido vários segundos antes da inconsciência ser atingida (VERHOEVEN et al., 2015b, 2016). Em um grupo de mais de trezentos bovinos submetidos a puntilha, 82% apresentaram respiração rítmica e 61% apresentaram resposta ao estímulo de ameaça (LIMON et al., 2010), sugerindo uma boa correlação entre estes. Todavia, este teste deve ser

associado a outros indicadores. Além disto, mais pesquisas são necessárias, incluindo diferentes contextos e espécies.

2.6.7. Ausência de respiração rítmica

Após o atordoamento, um animal que respira pode estar inconsciente, mas um animal que parou de respirar está inconsciente ou morto (VERHOEVEN et al., 2015a). A presença de respiração rítmica pós atordoamento é um indicador de que um segundo atordoamento é necessário (GRANDIN, 2013). Os músculos respiratórios são inervados por um centro de controle localizados na medula oblongada, localizados na parte inferior do tronco encefálico. Esses centros consistem em diferentes grupos de neurônios que controlam a inspiração e a expiração. Estes grupos de neurônios são ativados alternadamente e assim formam uma rede neurológica responsável pela respiração rítmica. Estes, por sua vez, são estimulados pela formação reticular, que recebe informações de núcleos localizados na periferia e dos centros cerebrais superiores (SIEGEL & SAPRU, 2006).

Gasping corresponde a movimentos inspiratórios intermitentes, bastante vigorosos, que não estão organizados da mesma forma que a respiração normal e podem ser induzidos por isquemia ou hipóxia (ST JOHN, 2009). *Gasping* reflete a disfunção dos centros cerebrais na ponte, o qual recruta mecanismos medulares (ST JOHN, 2009). O *gasping* precede a morte e não deve ser confundido com a respiração rítmica. É frequentemente acompanhada por sons guturais que, por sua vez, não devem ser confundidos com vocalizações. Blackmore (1982) observou a presença de *gasping* em um bezerro atordoado, cujo EEG tinha sido isoeletrico por 60 segundos – traçados isoeletricos na leitura dos resultados captados pelo EEG indicam ausência de atividade elétrica cerebral e, conseqüentemente, inconsciência.

Após uma insensibilização mecânica eficiente os movimentos respiratórios regulares desaparecem. Já para os animais sangrados que não são atordoados previamente, a respiração rítmica muda progressivamente para movimentos respiratórios irregulares (alternância de respiração superficial, ofegante, respiração

superficial rápida, apneias transitórias) (VERHOEVEN et al., 2015). Alguns autores consideram que a presença de *gasping* é indicativo de um atordoamento ineficiente quando métodos mecânicos são empregados, mas que alguns eventos podem ser observados mesmo após uma insensibilização elétrica bem-sucedida (GRANDIN, 2013). Gasping também pode ser um primeiro indicador de que um animal está se recuperando após atordoamento por gás (ATKINSON et al., 2012). A interrupção da respiração devido ao atordoamento mecânico pode ser explicada pela disfunção da formação reticular ou da medula. Para os métodos de atmosfera controlada, a interrupção da respiração após o uso de gás (sobrecarga de CO²/ausência de O²) é explicada pela diminuição da atividade neuronal dos hemisférios e do tronco encefálico. Em geral, a ausência de respiração causa anóxia no cérebro e, assim, contribui para o estado de inconsciência.

2.6.8. Ausência de reflexo ocular

Em princípio, após o atordoamento, um animal que apresenta reflexos oculares pode estar inconsciente, mas um animal que não os apresenta está inconsciente ou morto. A presença de reflexos oculares após o atordoamento é um indicador para prosseguir com um segundo atordoamento (GRANDIN, 2013). No entanto, para efetuar e interpretar o teste corretamente alguns aspectos devem ser considerados.

O reflexo da córnea é testado tocando levemente a córnea. O reflexo envolve a transmissão de informação sensorial ao tronco encefálico e uma resposta motora: se presente, o globo ocular é ligeiramente retraído e a pálpebra fecha. A informação sensorial passa pelo nervo trigêmeo para alcançar o núcleo trigeminal, próximo à formação reticular (CRUCCU & DEUSCHL, 2000). Este, por sua vez, está conectado ao núcleo facial para estimular o nervo motor facial, o que permite o fechamento da pálpebra. O núcleo trigeminal tem uma entrada adicional para os núcleos abducentes, estruturas que estão envolvidas na retração do globo ocular em sua órbita (DELGADO-GARCIA et al., 1990). Importante notar que as conexões entre os núcleos trigeminal e facial passam pela formação reticular (ARAMIDEH et al., 2002; DAUVERGNE et al., 2004).

No contexto do abate, o reflexo de córnea é considerado o reflexo ocular mais confiável para avaliar o estado de inconsciência. Qualquer interrupção do circuito neural subjacente causará a modificação ou a ausência do reflexo. O circuito neural responsável pelo reflexo de córnea atravessa a formação reticular. Se o reflexo da córnea estiver ausente, há uma grande probabilidade de que a ruptura esteja associada à uma disfunção mais ampla, compreendendo parte da formação reticular e, portanto, com um estado de inconsciência (CRUCCU et al., 1997; LAUREYS, 2005). Por esta razão, a ausência do reflexo de córnea é considerado um indicador bastante confiável de inconsciência.

A ausência do reflexo de córnea deve estar associada a outros indicadores de inconsciência. Por exemplo, lesões focais muito pequenas podem extinguir o reflexo de córnea, pelo menos unilateralmente, sem induzir inconsciência (ONGERBOER DE VISSER & KUYPERS, 1978). Esta situação é, no entanto, improvável no contexto de atordoamento ou sangria sem atordoamento. Pelo contrário, pois a disfunção da formação reticular a uma distância remota do circuito neural do reflexo de córnea ou a interrupção do sistema reticular ascendente podem induzir um estado de inconsciência sem abolir o reflexo de córnea. Por esta razão, um animal inconsciente pode apresentar reflexo de córnea, até mesmo no abate. Por exemplo, em um estudo com porcos, o retorno do reflexo de córnea foi observado em média 37 segundos após insensibilização elétrica. Nesta fase, na maioria dos matadouros, a sangria está ocorrendo e, devido a isso, é improvável que estes estejam conscientes. Nestes estudos, o retorno do reflexo de córnea não foi associado com o retorno de outros sinais, como a respiração rítmica, confirmando que o animal ainda estava inconsciente (MCKINSTRY & ANIL, 2004; VOGEL et al., 2011).

Um retorno temporário do reflexo de córnea é possível no contexto do abate sem atordoamento (BOURGUET et al., 2011). Esses retornos podem ser explicados por fenômenos diferentes. Como mencionado acima ("postura de pé"), alterações fisiológicas podem restaurar suficientemente a funcionalidade dos neurônios, o que permite uma recuperação temporária do reflexo (GREGORY et al., 2010). Esses sinais não são necessariamente indicativos de um retorno parcial

ou total da consciência, mas deixam uma dúvida (BOURGUET et al., 2011; GREGORY et al., 2010). Em segundo lugar, em certas circunstâncias o reflexo não pode ser testado corretamente e a aparente ausência inicial de um reflexo pode simplesmente ser devido a uma interpretação errada do resultado. Em particular, no caso de contração forte do músculo ocular, é impossível realizar o teste corretamente. Este pode ser o caso no abate religioso ou abate por puntilha, onde os músculos oculares dos bovinos podem se contrair após o início da sangria. Esta contração impede o fechamento da pálpebra em resposta à estimulação da córnea e o reflexo parece ausente, mas o animal pode estar consciente.

Aliás, esta contração frequentemente faz com que o globo ocular gire, tornando impossível alcançar a córnea e, portanto, realizar o teste (LIMON et al., 2010). Da mesma forma, para verificar um reflexo de córnea após atordoamento elétrico, é necessário esperar, pois o animal está em estado tônico e o reflexo é bloqueado (GRANDIN, 2013). Subsequentemente, o animal entra em estado clônico, caracterizado por movimentos vigorosos, como pedaleios, mas os músculos oculares também podem estar envolvidos, tornando mais difícil realizar o teste corretamente (GRANDIN, 2013). Finalmente, pode ser difícil, no entanto, realizar o reflexo de córnea quando o animal tem sangue nos olhos, como pode ocorrer durante a sangria.

O reflexo palpebral pode ser testado por meio de um leve toque na pálpebra, ou ao tocar levemente os cílios. As respostas são as mesmas, fechamento da pálpebra, e pelo menos para o reflexo palpebral, o circuito neural é em grande parte semelhante ao do reflexo de córnea. Sob certas condições, o reflexo palpebral parece menos resistente que o reflexo de córnea. Nos bovinos sangrados sem atordoamento o reflexo palpebral foi perdido antes do reflexo de córnea (BOURGUET et al., 2011; VERHOEVEN et al., 2016).

O reflexo ao toque nos cílios é considerado não confiável para a avaliação dos efeitos de determinadas anestésias farmacológicas (VUYK et al., 1992). Durante o abate sem atordoamento, o reflexo dos cílios é geralmente perdido após a perda do reflexo de córnea, sugerindo que este é mais resistente aos efeitos da

anóxia. Em comparação com o reflexo de córnea, pode ser mais difícil padronizar os testes de reflexo de pálpebra e de cílios no contexto do abate, e a interpretação exata da sua presença ou ausência necessitam de mais estudos.

O reflexo pupilar corresponde à contração da pupila quando exposto à luz e é uma avaliação importante para o prognóstico de pacientes comatosos (THOMAS, 2000). A presença de midríase (pupilas dilatadas) pode ser um indicador útil de um correto atordoamento elétrico em suínos (EFSA, 2004). O reflexo pupilar necessita, contudo, de uma condição funcional da retina. O sistema neurológico envolve o nervo óptico (informação sensorial) e os nervos oculomotores (resposta motora). O centro de integração está localizado no mesencéfalo, próximo à formação reticular. Este reflexo pode ser menos sensível após o início da sangria, porque a perda de sangue pode reduzir o funcionamento da retina (BLACKMAN et al., 1986). O sangue que cobre a córnea também pode reduzir a viabilidade deste teste.

Resumidamente, no contexto do abate, o reflexo de córnea é considerado o reflexo ocular mais confiável para avaliar o estado de inconsciência, mas deve ser associado a outros indicadores de inconsciência.

2.6.9. Indicadores com baixo poder discriminativo ou que necessitam de mais estudos

2.6.9.1. Tônus muscular

Após um atordoamento mecânico eficaz, bovinos colapsam com os membros mais ou menos dobrados, porém, depois de alguns segundos, os membros anteriores são esticados (ATKINSON et al., 2013). Após um atordoamento elétrico efetivo, um carneiro ou um porco que colapsa fica primeiramente rígido, com as patas traseiras dobradas e as dianteiras esticadas, devido a uma contração geral dos músculos, com duração de 10 a 20 segundos (fase tônica). Posteriormente, os animais apresentam movimentos involuntários de pedaleios durante 15 a 60 segundos (fase clônica, VELARDE et al., 2002). Em aves a fase tônica é caracterizada por extensão das patas, enquanto as asas são

pressionadas contra o corpo e o pescoço é arqueado. A fase clônica é caracterizada pelo bater de asas. O corpo de um animal atordoado pela inalação de CO² primeiramente relaxa, mas, posteriormente, as contrações musculares ocorrem, especialmente em aves (RAJ et al., 1990).

2.6.9.2. Rotação do globo ocular

Após atordoamento com dardo cativo, o bovino que não respira e não apresenta reflexo de córnea pode apresentar uma rotação do globo ocular (GREGORY et al., 2007; TERLOUW et al., 2016). Mesmo quando a rotação do globo ocular está presente ao mesmo tempo que sinais de inconsciência, sua presença indica que existe risco de que a concussão tenha sido insuficiente ou que o animal recobre a consciência (ATKINSON et al., 2013). Considerar o grau da rotação do globo ocular pode melhorar o seu poder discriminatório. Um estudo mostrou que a presença de uma rotação completa requeria um segundo atordoamento, enquanto uma rotação parcial exigia maior monitoramento do animal (ATKINSON et al., 2013). Durante o abate sem atordoamento, a rotação do globo ocular pode ocorrer enquanto o animal ainda está consciente (TERLOUW et al., Observações pessoais). No entanto, nos estágios posteriores, a rotação ocular pode estar associada a um estado de profunda inconsciência (GRANDIN, 2013). Os movimentos do globo ocular dependem de seis músculos extra-oculares que recebem informações de diferentes centros cerebrais inferiores, incluindo os núcleos oculomotores, troclear e abducente, localizados na ponte e mesencéfalo do tronco encefálico. Estes centros inferiores do cérebro são controlados por centros cerebrais mais elevados (ENDERLE, 2000; TEHOVNIK et al., 2000). Os mecanismos subjacentes aos movimentos dos globos oculares após o atordoamento e após o abate sem atordoamento ainda não são conhecidos.

2.6.9.3. Nistagmo

O nistagmo é uma rápida oscilação vertical ou horizontal do globo ocular devido a contrações repetidas de músculos extraoculares. O nistagmo é indicativo

de danos nos circuitos subjacentes no tronco cerebral, mas também pode resultar de danos ao cerebelo ou sistema vestibular (HÜFNER et al., 2007).

O nistagmo é considerado um indicador com baixo poder discriminatório. Um estudo com atordoamento por dardo cativo em bovinos mostrou que o nistagmo ocorria raramente (3% dos animais), mas quando estava presente, havia uma chance em três de o atordoamento ter sido ineficiente (GREGORY et al., 2007). Esta estimativa é consistente com outros estudos (BOURGUET et al., 2011; TERLOUW et al., 2016).

2.6.9.4. Resposta a estímulos dolorosos

Para avaliar a resposta a um estímulo doloroso, pode ser testada a resposta de afastamento após uma picada com uma agulha hipodérmica (nas pontas do ouvido ou no septo nasal, por exemplo), ou pulverização com água quente (PAROTAT et al, 2015).

Atualmente, o teste de dor precisa de mais pesquisas para melhorar seu poder discriminatório. Certas respostas aos estímulos dolorosos requerem atividade cortical e, devido a isso, são utilizados como indicativos da consciência. Outras respostas a estímulos dolorosos podem ser simples respostas *nociceptivas* (arco-reflexo), com base em um circuito envolvendo a medula espinhal, mas não o cérebro. Uma experiência simples pode ser feita no teste do reflexo do joelho a uma leve batida na parte inferior da rótula. A resposta automática caracteriza um fenômeno conhecido como 'reflexo patelar monosináptico'. Por exemplo, no estudo de Terlouw et al. (2016), alguns bovinos mostraram um movimento do pescoço na direção ventral em resposta ao corte da pele e dos vasos sanguíneos durante a sangria do animal. Esta reação foi mais fraca em touros após longos intervalos entre atordoamento e sangria. Este movimento é provavelmente uma resposta reflexa nociceptiva baseada em um circuito neural que passa através da medula espinhal, mas não o cérebro. A resposta mais forte aconteceu nos touros sangrados mais cedo após o atordoamento, indicando que os nervos envolvidos na resposta do arco-reflexo tinham ainda um certo grau de funcionalidade. A reação ao corte da pele e tecidos não pode, portanto, ser usada como um

indicador de consciência. De modo semelhante, ovelhas farmacologicamente anestesiadas apresentando um EEG indicativo de inconsciência responderam a uma agulhada na orelha (VERHOEVEN et al., 2015b). Assim, certas respostas de dor não são necessariamente indicativas de consciência.

Vale também considerar que, em certas ocasiões, o animal pode receber o estímulo doloroso, interpretá-lo a nível cerebral e, apesar disto, ser incapaz de se manifestar. Na medicina humana pacientes acometidos pela *Síndrome do Encarceramento* (locked-in syndrome) – causado por uma lesão no tronco cerebral – podem estar completamente paralisados, mas ainda assim estão plenamente conscientes, o que é comprovado por atividade cortical captada por EEG ou auto relato pós transtorno.

2.6.9.5. Movimentos aparentemente espontâneos do pescoço ou patas após atordoamento

Após atordoamento ou abate sem atordoamento os animais frequentemente apresentam pedaleios, movimentos do pescoço ou dorso, movimentos estes que não estão associados com a fase clônica após o atordoamento elétrico (GRANDIN, 2013). Um estudo mostrou que os pedaleios em bovinos corretamente atordoados é provavelmente um movimento involuntário ligado aos centros geradores de ritmo das estruturas cerebrais e da medula espinhal (TERLOUW et al., 2016) envolvidos na produção de movimentos motores rítmicos, como andar (GUERTIN, 2009, FRIGON, 2012). O funcionamento desses geradores é independente da consciência.

Movimentos laterais do pescoço são difíceis de interpretar. Vacas atordoadas e num estado de profunda inconsciência podem frequentemente mostrar movimentos do pescoço (BOURGUET et al., 2011; TERLOUW et al., 2016). No entanto, nos touros, apenas os animais com sinais oculares (nistagmo, rotação dos globos oculares, piscadas espontâneas) ou respiração, mostraram movimentos do pescoço.

Nenhum dos touros apresentou reflexo de córnea, o que sugere que esses animais estavam inconscientes. Os resultados sugerem que, após o

atordoamento, o grau de lesão das áreas cerebrais afetadas ou o tipo de estruturas danificadas influenciam a expressão deste comportamento, mesmo se os animais estiverem corretamente atordoados. Em resumo, no abate, é essencial utilizar uma abordagem múltipla para verificar os indicadores de consciência e inconsciência. Postura ereta e vocalizações voluntárias são sinais de consciência e devem estar ausentes. A ausência de reflexos e movimentos oculares e a ausência de respiração rítmica são sinais-chave de inconsciência. O reflexo da córnea é geralmente considerado como o reflexo ocular de referência. Se este está ausente e há uma perda permanente da postura de pé e nenhuma respiração rítmica, então é considerado que o animal foi atordoadado de forma eficaz. Alguns indicadores, como o nistagmo, têm baixo poder discriminatório e sua presença requer a verificação de outros indicadores, bem como o monitoramento do animal até a morte (TERLOUW et al., 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS R. D.; SIDMAN, R. L. **Introduction to Neuropathology**. New York: McGraw-Hill; 1968.

ANIL, M. H. Studies on the return of physical reflexes in pigs following electrical stunning. **Meat Science**, v. 30, n. 1, p. 13-21, 1991.

ARAMIDEH, M.; ONGERBOER DE VISSER, B. W. Brainstem reflexes: electrodiagnostic techniques, physiology, normative data, and clinical applications. **Muscle & nerve**, v. 26, n. 1, p. 14-30, 2002.

ATKINSON, S.; VELARDE, A.; LLONCH, P.; ALGERS, B. Assessing pig welfare at stunning in Swedish commercial abattoirs using CO. **Animal Welfare**, v. 21, p. 487-495, 2012.

BERNARD, B. The concept of consciousness. In: WATSON, C.; KIRKCALDIE, M.; PAXINOS, G. **The Brain: An Introduction to Functional Neuroanatomy** 1 ed. London: Elsevier, 2010. p. 98-101.

BLACKMAN, N. L.; CHEETHAM, K.; BLACKMORE, D. K. Differences in blood supply to the cerebral cortex between sheep and calves during slaughter. **Research in veterinary science**, v. 40, n. 2, p. 252-254, 1986.

BLACKMORE, D. K.; NEWHOOK, J. C. Electroencephalographic studies of stunning and slaughter of sheep and calves — Part 3: The duration of insensibility induced by electrical stunning in sheep and calves. **Meat Science**, v. 7, p. 19-28, 1982.

BLACKMORE, D. K., DELANEY, M. W. **Slaughter of Stock: A Practical Review and Guide**. New Zealand: Palmerston North, 1988 p. 137.

BOUR, L.; ONGERBOER DE VISSER, B.; ARAMIDEH, M.; SPEELMAN, J. Origin of eye and eyelid movements during blinking. **Movement Disorders**, v. 17, p. 30-32, 2002.

BOURGUET, C., DEISS, V.; TANNUGI, C. C.; TERLOUW, E. M. C. Behavioural and physiological reactions of cattle in a commercial abattoir: Relationships with organisational aspects of the abattoir and animal characteristics. **Meat Science**, v. 88, p. 158-168, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº3, de Janeiro de 2000. Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para Abate Humanitário de Animais de Açougue. Diário Oficial [da] União, Brasília, 24 jan.2000;

BROWN, R. E.; BASHEER, R.; MCKENNA, J. T.; STRECKER, R. E.; MCCARLEY, R. W. Control of sleep and wakefulness. **Physiological reviews**, v. 92, n. 3, p. 1087-1187, 2012.

CAREY M. E. Experimental missile wounding of the brain. In: NARAYAN, R. K; WILBERGER, J. E; POVLISHOCK, J. **Neurotrauma**. New York: McGraw-Hill, 1996.

CRICK, F; KOCH, C. Are we aware of neural activity in primary visual cortex? **Nature**, v. 375, 6527, p. 121, 1995.

CRUCCU, G.; DEUSCHL, G. The clinical use of brainstem reflexes and hand-muscle reflexes. **Clinical Neurophysiology**, v. 111, p. 371-387, 2000.

CRUCCU, G.; LEARDI, M. G.; FERRACUTI, S.; MANFREDI, M. Corneal reflex responses to mechanical and electrical stimuli in coma and narcotic analgesia in humans. **Neuroscience letters**, v. 222, p. 33-36, 1997.

DANCKERT, J.; GOODALE, M. A. Blindsight: A conscious route to unconscious vision. **Current Biology**, v. 10, p. 64-67, 2000.

DAUVERGNE, C.; NDIAYE, A.; BUISSERET-DELMAS, C.; BUISSERET, P.; VANDERWERF, F.; PINGANAUD, G. Projections from the superior colliculus to the trigeminal system and facial nucleus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 478, p.233-247, 2004.

DELGADO-GARCIA, J. M., EVINGER, C., ESCUDERO, M., & BAKER, R. Behavior of accessory abducens and abducens motoneurons during eye retraction and rotation in the alert cat. **Journal of Neurophysiology**, v. 64, p. 413-422, 1990.

DiMAIO, V. J. M. **Gunshot Wounds: Practical Aspects of Firearms, Ballistics, and Forensic Techniques**. Florida: Boca Raton CRC Press, 1999.

DÖRFLER, K.; TROEGER, K.; LÜCKER, E.; SCHÖNEKEß, H.; FRANK, M. Determination of impact parameters and efficiency of 6.8/15 caliber captive bolt guns. **International Journal of Legal Medicine**, v. 128, p. 641-646, 2014.

EFSA. Welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals. **The EFSA Journal**, v. 45, p. 1-29.

EFSA. Scientific opinion on monitoring procedures at slaughterhouses for bovines. **The EFSA Journal**, v. 11, p. 65, 2013.

ENDERLE, J. D. The fast eye movement control system.. In: Joseph, D. **The biomedical engineering handbook**. 2. ed. Bronzino Boca Raton: CRC Press, 2000.

FACKLER, M. L. Gunshot wound review. **Annual Emergency of Medicine**, v. 28, p. 194-203, 1996.

FAROUK, M. M. Advances in the industrial production of halal and kosher red meat. **Meat Science**, v. 95, p. 805-820, 2013.

FERRAZ, J.B.S.; FELICIO, P. E. Production systems — An example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, p. 238-243, 2010.

FINNIE J. W.; BLUMBERGS, P. C.; MANAVIS J.; SUMMERSIDES, G. E.; DAVIES, R. A. Evaluation of brain damage resulting from penetrating and non-penetrating captive bolt stunning using lambs. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 11, p. 775-778, 2000.

FINNIE, J. W.; VAN DEN HEUVEL C.; GEBSKI, V.; MANAVIS, J.; SUMMERSIDES, G. E.; BLUMBERGS, P. C. Effect of impact on different regions

of the head of lambs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 124, n. 2, p. 159-164, 2001.

FINNIE, J. W. Traumatic head injury in ruminant livestock. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, p. 204-208, 1997.

FRIGON, A.. Central pattern generators of the mammalian spinal cord. **The Neuroscientist**, v. 18, p. 56-69, 2012.

GIBSON, T. J.; DADIOS, N.; GREGORY, N. G. Effect of neck cut position on time to collapse in halal slaughtered cattle without stunning. **Meat Science**, v. 110, p. 310-314, 2015.

GRANDIN, T. (2013). Recommended animal handling guidelines and audit guide: A systematic approach to animal welfare. AMI Foundation.

GREGORY, N.G. Stunning and slaughter. In: Animal Welfare and Meat Science. Cabi Publishing, p.223-240, 1998.

GREGORY, N. G.; FIELDING, H. R.; von WENZLAWOWICZ, M.; von HOLLEBEN, K. Time to collapse following slaughter without stunning in cattle. **Meat Science**, v. 85, p. 66-69, 2010.

GREGORY, N. G.; FIELDING, H. R.; von WENZLAWOWICZ, M.; von HOLLEBEN, K. Time to collapse following slaughter without stunning in cattle. **Meat Science**, v. 85, p. 66–69, 2010.

GREGORY, N. G.; LEE, C. J.; WIDDICOMBE, J. P. Depth of concussion in cattle shot by penetrating captive bolt. **Meat Science**, v. 77, p. 499-503, 2007.

GUERTIN, P. A. The mammalian central pattern generator for locomotion. **Brain Research Reviews**, v. 62, p. 45-56, 2009.

HÜFNER, K.; STEPHAN, T.; KALLA, R.; DEUTSCHLA, A.; WAGNER, J.; HOLTSMANN, M.; GLASAUER, S. Structural and functional MRIs disclose cerebellar pathologies in idiopathic downbeat nystagmus. **Neurology**, v. 69, p. 1128-1135, 2007.

LAUREYS, S. Science and society: Death, unconsciousness and the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, p. 899-909, 2005.

LAUREYS, S.; BERRÉ, J.; GOLDMAN, S. Cerebral function in coma, vegetative state, minimally conscious state, locked-in syndrome, and brain death. In: **Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine 2001**. Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 386-396.

LIMON, G.; GUITIAN, J.; GREGORY, N. G. An evaluation of the humaneness of puntilla in cattle. **Meat Science**, v. 84, p. 352-355, 2010.

LIU, G. T.; RONTAL, M. Reflex blink to visual threat. **Journal of Clinical Neuro-Ophthalmology**, v. 12, p. 47-56, 1992.

McKINSTRY, J. L.; ANIL, M. H. The effect of repeat application of electrical stunning on the welfare of pigs. **Meat Science**, v. 67, p. 121-128, 2004.

MORCUENDE, S.; DELGADO-GARCIA, J. M.; UGOLINI, G. Neuronal premotor networks involved in eyelid responses: Retrograde transneuronal tracing with rabies virus from the orbicularis oculi muscle in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 8808-8818, 2002

OEMICHEN M.; MEISSNER C.; KONIG H. G. Gunshot injuries to the head and brain caused by low-velocity handguns and rifles: a review. **Forensic science international**, v. 146, n. 2, p. 111-120, 2004.

OMMAYA A. K.; GOLDSMITH, W; THIBAUT, L. Biomechanics and neuropathology of adult and paediatric head injury. **British journal of neurosurgery**, v. 16, n. 3, p. 220-242, 2002.

ONGERBOER DE VISSER, B. W.; KUYPERS, H. G. Late blink reflex changes in lateral medullary lesions. An electrophysiological and neuro-anatomical study of Wallenberg's Syndrome. **Brain**, v. 101, p. 285-294, 1978.

PAROTAT, S.; von HOLLEBEN, K.; ARNOLD, S.; TROEGER, K.; LUECKER, E. Hot-water spraying is a sensitive test for signs of life before dressing and scalding

in pig abattoirs with carbon dioxide (CO₂) stunning. **Animal**, v. 10, n. 02, p. 326-332, 2016.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C. A-S.; LaMANTIA, A. S.; McNaMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. **Motor control centers in the brainstem: Upper motor neurons that maintain balance and posture**. Sunderland: Sinauer Associates, 2001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11081/>.

ROÇA, R. O. Abate humanitário de bovinos. In: Roça, R. O. **I Conferência virtual Global sobre produção orgânica de bovinos de corte**. Via internet 2002, p.01-15.

ROSSEN, R. R.; KABAT, H.; ANDERSON, J. P. Acute arrest of cerebral circulation in man. **Archives of Neurology and Psychiatry**, v. 50, p. 510-528, 1943.

SELLIER, K.; KNEUBUEHL, B. P. **Wound Ballistics and the Scientific Background**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 1994.

Siegel, A., & Sapru, H. N. (2006). The reticular formation, part 23. In A. Siegel, & H. N. Sapru (Eds.), *The neuron. Essential Neuroscience, Section IV*. (pp. 427–444). Philadelphia, London/Tokyo, Hong Kong: Lippincott Williams and Wilkins.

ST JOHN, W. M. Noeud vital for breathing in the brainstem: gasping—yes, eupnoea—doubtful. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1529, p. 2625-2633, 2009.

STOERIG, P. Hunting the ghost: toward a neuroscience of consciousness. In: Zelazo, P. D.; Moscovitch, M.; Thompson, E. **Cambridge Handbook of Consciousness**. New York: Cambridge University press, 2007.

STURGES, B. K. Neuro-ophthalmology: The visible nervous system. PROCEEDINGS OF THE 2ND ANNUAL VETERINARY NEUROLOGY SYMPOSIUM, 2005, Davis. **Resumos...** Davis: AVNS, 2005.

SUMMERS, B.A., CUMMINGS, J.F., DELAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. St Louis: Elsevier, 1995.

TEHOVNIK, E. J.; SOMMER, M. A.; CHOU, I. H.; SLOCUM, W. M.; SCHILLER, P. H. Eye fields in the frontal lobes of primates. **Brain Research Reviews**, v. 32, n. 2, p. 413-448, 2000.

TERLOUW, E. M. C.; BOURGUET, C.; DEISS, V. Consciousness, unconsciousness and death in the context of slaughter. Part I. Neurobiological mechanisms underlying stunning and killing. **Meat Science**, v. 118, p. 133-146, 2016.

Terlouw, E. M. C., Bourguet, C., Deiss, V., Mallet, C. Origins of movements following stunning and during bleeding in cattle. **Meat Science**, v. 110, p. 135-144. 2015.

Thomas, P. D. (2000). The differential diagnosis of fixed dilated pupils: a case report and review. **Critical Care and Resuscitation**, v. 2, n. 1, p. 34, 2000.

USDA-FAS. (April 2014). United States Department of Agriculture (USDA). Foreign Agricultural Service. Office of Global Analysis. Livestock and poultry: world markets and trade.

VERHOEVEN, M. T.; GERRITZEN, M. A.; HELLEBREKERS, L. J.; KEMP, B. Indicators used in livestock to assess unconsciousness after stunning: a review. **Animal**, v. 9, n. 02, p. 320-330, 2015a.

VERHOEVEN, M. T. W.; GERRITZEN, M. A.; KLUIVERS-POODT, M.; HELLEBREKERS, L. J.; KEMP, B. Validation of behavioural indicators used to assess unconsciousness in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 144-153, 2015b.

VERHOEVEN, M. T.W.; HELLEBREKERS, L. J.; GERRITZEN, M. A.; KEMP, B. Validation of indicators used to assess unconsciousness in veal calves at slaughter. **Animal**, v. 10, n. 09, p. 1457-1465, 2016.

VOGEL, K. D.; BADTRAM, G.; CLAUS, J. R.; GRANDIN, T.; TURPIN, S.; WEYKER, R. E.; VOOGD, E. (). Head-only followed by cardiac arrest electrical stunning is an effective alternative to head-only electrical stunning in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1412-1418, 2011

VUYK, J.; ENGBERS, F. H. M.; LEMMENS, H. J.M.; BURM, A. G. L.; VLETTER, A. A.; GLADINES, M. P. R. R.; BOVILL, J. G. Pharmacodynamics of propofol in female-patients. **Anesthesiology**, v. 77, p. 3-9, 1992.

Watson, C. The Neurology of Consciousness: An Overview. (2010). Available from: https://www.researchgate.net/publication/265077409_The_Neurology_of_Consciousness_An_Overview [accessed Jan 18, 2017].

WATTS, J. M.; STOOKEY, J. M. Vocal behaviour in cattle: The animal's commentary on its biological processes and welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 67, p. 15-33, 2000

WIJDICKS, E. F. The diagnosis of brain death. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1215-1221, 2001.

ZEMAN, Adam. What in the world is consciousness? **Progress in brain research**, v. 150, p. 1-10, 2005.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO MEAT SCIENCE

Efficiency of low versus high airline pressure in stunning cattle with a pneumatically powered penetrating captive bolt gun

Steffan Edward Octávio Oliveira*^{a,b}, Neville George Gregory^c, Filipe Antonio Dalla Costa^{a,b}, Troy John Gibson^c, Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa^{a,b}

^a Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 14.884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

^b Grupo de Estudos e Pesquisas em Etologia e Ecologia Animal, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 14.884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

^c Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

*Corresponding author:

E-mail address: steffan_edward@yahoo.com.br (S. E. O. Oliveira)

ABSTRACT

The efficiency of stunning cattle was assessed in 443 animals (304 pure Zebu and 139 crossbred cattle). Cattle were stunned using pneumatically powered penetrating captive bolt gun operating with low (160-175 psi, N= 82) and high (190 psi, N= 363) airline pressure. Signs of brain function and the position of the shots on the heads were recorded after stunning. Velocity of the captive bolt and its physical parameters were calculated. Cattle shot with low pressures showed more rhythmic respiration (27 vs. 8%, $P < 0.001$), less tongue protrusion (4 vs. 12%, $P = 0.03$) and less masseter relaxation (22 vs. 48%, $P < 0.001$). There was an increased frequency of shots in the ideal position when cattle were shot with the low compared to high airline pressures (15.3 vs. 3.1%). Bolt velocity

and its physical parameters were significantly ($P < 0.01$) higher when using high pressure. Airline pressures below 190 psi are inappropriate when shooting adult Zebu beef cattle with pneumatically powered penetrating captive bolt guns.

Keywords: airline pressure; bolt velocity; consciousness; rhythmic respiration; shot

1. Introduction

The aim of penetrative captive bolt stunning is to induce a deep and irreversible form of concussion prior to the act of slaughter (Gregory, 2007). Shooting an animal with pneumatically powered penetrating captive bolt guns is one of the most common methods of cattle stunning in large abattoirs. This method consists of delivering a blow to the animal's head, which is designed to penetrate its cranium, causing massive damage to the brain and induce insensibility.

The assessment of stunning efficiency is generally done by evaluating behavioral and physical signs of depth of concussion and include: the immediate collapse of the animal after stunning, which is used as an indicator of the potential loss of consciousness (Schepens & Drew, 2004; Terlouw, Bourguet, & Deiss, 2016); absence of corneal reflex, which indicates a large probability that the disruption is associated with a wider dysfunction, comprising part of the reticular formation, and thus with a state unconsciousness (Sturges, 2005; Bourguet, Deiss, Tannugi & Terlouw, 2011); absence of eye pursuit movements, which does not necessarily indicate unconsciousness, but its presence is considered indicative of the presence of consciousness (Terlouw et al., 2016); eyeball facing forward, as its rotation indicates that there is a risk of a shallower depth of unconsciousness or a return of consciousness (Atkinson, Velarde, & Algers, 2013) and absence of rhythmic breathing, since this sign indicates that the medulla in the brain and

also the spinal cord plus nerves (which control breathing movements in the body) are still functioning (Gregory, 2007).

As stated by Gibson, Mason, Spence, Barker, & Gregory (2015), insensibility is caused by a combination of direct damage to the brain and the kinetic energy delivered to the animal's head. The kinetic energy transmitted through the bolt depends upon its mass and is directly proportional to the square of its velocity. Dörfler, Troeger, Lückner, Schönekeß, & Frank (2014) observed that when shooting with cartridge powered captive bolt guns, only one third to one half of the potential energy of the cartridge is transformed into kinetic energy of the captive bolt (since part of its potential energy is probably wasted as heat energy when the cartridge is fired). Based on this, the authors concluded that efficiency of captive bolt devices powered by cartridge is rather low. On the other hand, pneumatically powered captive bolt guns use compressed air as the potential energy when the gun is fired, which minimize energy to be wasted as heat as with cartridge powered guns. Thus, the air pressure level in the gun's air chamber before shooting may affect the velocity of the bolt, the amount of kinetic energy delivered to the animal's head and, consequently, the efficiency of stunning.

Although most of the gun manufacturers provide information about the operating airline pressure ranges, there are no studies examining the effects of different airline pressures on the efficiency of cattle stunning. Therefore, the objective of this study was to assess the efficiency of stunning cattle using pneumatically powered penetrating captive bolt guns operating with low and high airline pressures.

2. Materials and methods

This project was approved by the Committee of Ethical Use of Animals (Protocol number: 022754/14).

2.1. Abattoirs description

The study was carried out through nine days during the routine daily stunning and slaughter of cattle at two beef abattoirs belonging to the same company. Combined, both abattoirs slaughters approximately 1300 animals/day, mainly bulls (over 550 kg liveweight) and old cows (over 400 kg liveweight). The animals were individually restrained in a pneumatic stunning pen equipped with a head yoke and then stunned by an experienced slaughterman with a pneumatically powered penetrating captive bolt gun (PCB). After the animal has rolled out of the stunning pen, it was shackled and then hoisted onto a bleeding rail, where a third slaughterman stuck it by inserting a knife into the thoracic cavity. According to the user's manual provided by the manufacturer, the operating airline pressure of the guns used at both abattoirs is within a range of 160-190 *psi* (USSS-1, JARVIS[®] Jarvis Products Corporation; Middletown, CT, USA). The abattoirs are regulated by the Brazilian Federal Inspection Service.

2.2. Animals and airline pressures

Two levels of airline pressure were tested: Low pressure, adjusted within the range of 160-175 *psi* (N= 82) and High pressure, set to 190 *psi* (N= 363). The control and verification of the desired airline pressure was done through the pressurization system and manometers of each abattoir. A total of 176 Zebu pure (110 and 66 from abattoir A and B, respectively) and 267 crossbred Zebu (31 and 236 from abattoir A and B, respectively) were assessed for this study.

2.3. Assessment of physical signals of brain function

The state of consciousness and response to pain in stunned cattle were assessed by recording twelve physical signals in three different stages of the production line: with the animal on the ground, just after it had rolled out of the stunning pen (GR) and being hoisted

(HO), and before bleeding, at the beginning of the bleeding rail (BL). A person, standing on the platform of the stunning pen, recorded the general information about the animals (breed, category, and gender), if they collapsed or not after the first shot and the interval between stunning and sticking. Another person recorded the physical signals of brain function at GR and HO, and a third person did it at BL. Shot accuracy was assessed at BL by placing a grid printed on transparent plastic onto the head of the shot cattle and measuring the deviation between the shot hole and the ideal shooting position, defined by Gregory (2007) as the cross-over point between imaginary lines drawn between the base of each horn and the corner of the eye on the opposite side of the head.

The following physical signs were recorded: rhythmic respiration (excluding spasmodic gasping and gagging), corneal reflex (assessed in response to light rubbing of the exposed cornea with a finger), palpebral reflex (evaluated in response to pinching the eyelid with two fingers), eyeball rotation (assessed from the presence of sclera in the exposed eye), response to nostril stimulation (assessed in response to scratching a fingernail inside the nostril), tremor (visible in the underside of the animal, originating in the muscles of the limbs and belly), righting reflex (defined as lateral turning of the head associated with apparent struggling movements), tongue protrusion (identified when animal's tongue protruded out at least 10 cm), masseter relaxation (recognized as little or no resistance to the opening of the masseter), blood extravasation (blood flowing out of mouth and/or nostrils after stunning), tonic convulsion (rigid extension or contraction of legs) and clonic convulsion (assessed according to a 0 - 3 kicking score: 0= no kicking; 1= mild kicking; 2= vigorous kicking but not sufficient to delay shackling and sticking; 3= violent kicking activity which endangered staff).

2.4. Bolt velocity measurements and determination of physical parameters

A custom-built velocity meter (Solutions for Research, Silsoe, Bedford, UK) was used to measure velocity of the captive bolt when it was fired in air. The measurements were done with the airline pressure set to 160, 175 and 190 *psi*. This device measures the time taken for the bolt to transect a series of seven infrared LEDs. Each LED is placed 4 mm apart. The time taken to transect consecutive LEDs is recorded as bolt velocity. Recorded data were stored through the velocity meter software for further analyses (2009 CBG Tester[®], Royal Veterinary College) of bolt velocity profile through the velocity meter and peak velocity. The mass of the dismantled captive bolt was measured with a precision laboratory balance and the following physical parameters were calculated:

(a) Momentum (p , in Newton-second) of the captive bolt was calculated according to its mass (m , in kilogram) and velocity (v , in meters per second) by the formula

$$p = m v.$$

(b) Kinetic energy (E_{kin}) of the bolt was calculated based on its mass (m , in kilogram) and velocity (v , in meters per second) by the formula

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m v^2.$$

(c) Energy density (E) was calculated from the kinetic energy of the bolt divided by the bolt's cross-sectional area or effective impact area (A ; Kneubuehl, Coupland, Rothschild, & Thali, 2011).

$$E = \frac{E_{kin}}{A} = \frac{\frac{1}{2} m v^2}{\pi d^2}.$$

2.5. Statistical analysis

Data were firstly submitted to an exploratory analysis and then analyzed by two-tailed Fisher Exact test with Graphpad software (2015 Graphpad Software, Inc) to verify the effect of the airline pressure in the physical signals of brain function of cattle. The sampling

unit was each individual animal. Multiple comparisons of the values of bolt velocities were performed using the Tukey-Kramer test using the shot as experimental unit, and the statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Physical signals of brain function

There was a significant difference ($P < 0.001$) in rhythmic respiration, between the two airline pressures at GR. When shot with low airline pressure, more animals (27%) presented rhythmic respiration than the group shot with high pressure (8%). Low pressure also resulted in less tongue protrusion (4 vs. 12%, $P = 0.02$) and masseter relaxation (22 vs. 48%, $P < 0.001$) than high pressure. At HO, low pressure resulted in less blood extravasation (1 vs. 22%, $P < 0.001$) and more tonic convulsion (8 vs. 0.3%, $P = 0.02$) than high pressure. There was a tendency towards statistical significance of more rhythmic respiration for low pressure at HO (5 vs. 1%, $P = 0.06$) and tremor at BL (10 vs. 4%, $P = 0.06$; Table1).

Table 1. Prevalence of physical signs of brain function in cattle after being shot with pneumatic penetrating captive bolt gun at low airline pressure (LP = 160-175 psi) and high airline pressure (HP = 190 psi) assessed on the ground, just after the animal had rolled out of the stunning pen (GR), just after being hoisted (HO), and at the bleeding rail (BL).

Local of assessment and physical signals	LP (N=82) (% of occurrence)	HP (N=363) (% of occurrence)
<i>Stunning pen</i>		
Immediate collapse after shot	98	99
<i>GR</i>		
Rhythmic respiration	27 ^a	8 ^b
Righting reflex	0	1
Tremor	19	28
Masseter relaxation	22 ^b	48 ^a
Tongue protrusion	4 ^b	12 ^a
Responding to nostril stimulation	5	3
Palpebral reflex – Corneal reflex	2	1
Eyeball rotation	1	1
Tonic convulsion	58	62
Clonic convulsion (score 1)	16	20
Clonic convulsion (score 2 or 3)	16	14
<i>HO</i>		
Rhythmic respiration	5	1
Righting reflex	23	16
Tremor	10	6
Tongue protrusion	44	46
Blood extravasation	1 ^b	22
Tonic convulsion	8 ^a	0.3 ^b
Clonic convulsion (score 1)	34	34
Clonic convulsion (score 2 or 3)	27	25
<i>BL</i>		
Rhythmic respiration	2	2
Righting reflex	5	3
Tremor	10	4
Tongue protrusion	61	61
Clonic convulsion (score 1)	8	9
Clonic convulsion (score 2 or 3)	7	6

Frequencies in a row without a common superscript letter were significantly different ($P < 0.05$)

3.2. Shooting accuracy

There was an increased frequency of shots in the ideal position when cattle were shot with the low compared to high airline pressures (Table 2; $P < 0.001$). The percentage of shots that deviated more than two centimeters from the ideal shooting position was greater for high pressure than low pressure (65.4 vs. 35%, respectively; $P < 0.001$).

Table 2. Frequency of shots at the ideal shooting position in cattle heads and the deviation in cm from that position, when shot with pneumatically powered penetrating captive bolt guns operating with low (LP = 160-175 *psi*) and high (HP = 190 *psi*) airline pressure.

Shot deviation from the ideal shooting position (cm)	LP (N=82) (% of shots)	HP (N=353) (% of shots)	<i>P</i>
Ideal shooting position	15.3	3.1	< 0.001
1	27.1	12.4	0.001
2	22.6	19.2	0.64
3	21.4	19.8	0.65
4	8.3	18.1	0.01
5	1.4	11.9	0.001
6	1.4	8.8	0.01
7	0	5.1	0.03
8	2.5	1.4	0.62
9	0	0.3	1

3.3. Bolt physical parameters

There was a significant difference ($P < 0.05$) in bolt velocity between the airline pressures. As the airline pressure was increased from 160 to 190 *psi*, bolt mean peak velocity increased. Bolt physical parameters, such as momentum, kinetic energy and energy density also showed a linear augmentation, with the highest airline pressure (190 *psi*) being significantly different from the others ($P < 0.05$; Table 3).

Table 3. Mean values (\pm SD) of recorded bolt velocity and calculated values of momentum, kinetic energy and energy density according to the airline pressure.

Airline pressure (<i>psi</i>)	Number of shots	Bolt weight (<i>kg</i>)	Mean peak bolt velocity \pm SD (<i>m/s</i>)	S.E.	Momentum \pm SD (<i>Ns</i>)	S.E.	Kinetic energy \pm SD (<i>J</i>)	S.E.	Energy density \pm SD (<i>J/mm²</i>)	S.E.
160	19	0.297	47.7 ^b \pm 0.44	0.43	14.2 ^b \pm 0.13	0.56	338 ^b \pm 6.26	26.56	1.7 ^b \pm 0.03	0.13
175	21	0.297	48.8 ^b \pm 0.74	1.07	14.5 ^b \pm 0.21	0.98	356 ^b \pm 11.08	49.57	1.8 ^b \pm 0.05	0.25
190	21	0.297	54.6 ^a \pm 1.33	1.30	16.2 ^a \pm 0.39	1.77	448 ^a \pm 22.02	98.50	2.3 ^a \pm 0.11	0.50

Means in a column without a common superscript letter were different according to Tukey's test ($P < 0.01$)

Figure 1 is the mean velocity profiles of the captive bolt guns for the three airline pressures. The measurements for bolt velocity along the velocity meter showed that the peak velocity for all three airline pressures occurred when the bolt transected the fourth infrared LED, which was positioned 12 mm from the top of the velocity meter. The distance from the recessed bolt to this sensor was 98 mm.

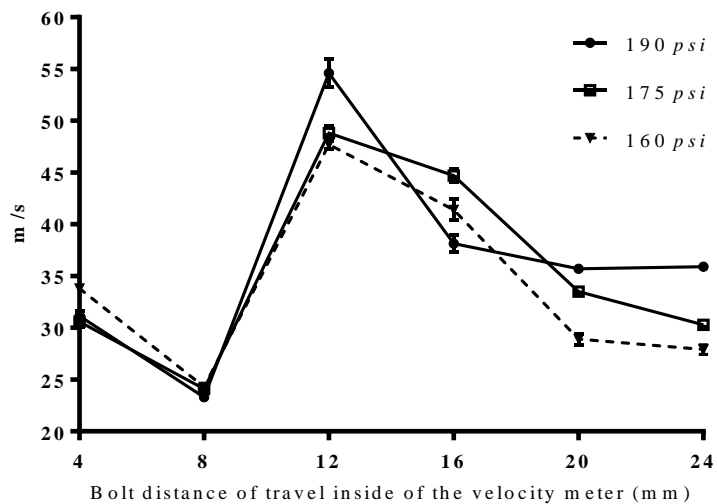


Figure 1. Bolt velocity profile through the velocity meter according to the airline pressure.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the effects of airline pressure on the efficiency of pneumatic penetrative captive bolt stunning of cattle.

In spite of the relatively small difference in the levels of air pressure, the results found in this study demonstrate the importance of choosing high airline pressures instead of low, since cattle presented fewer signs of imperfect stunning and the PCB guns performed better.

Initially 36 and 46 cattle were shot with airline pressures of 160 and 175 *psi*, respectively. Following a significant proportion of animals showing signs of rhythmic respiration after the shot it was decided to end assessment of these pressures and to increase to 190 *psi*.

The position of the shots on the cattle heads did not explain why high pressure was more efficient than low pressures in stunning the cattle. There was not a higher frequency of shots at the ideal shooting position, which is described as the cross-over point between imaginary lines drawn between the base of each horn and the corner of the eye on the opposite side of the head (Gregory, 2007), at the higher airline pressure, but instead low

pressures shots were more accurate than the high pressure shots (Table 2). Moreover, 65% of the low pressure shots were positioned within the recommended 2-cm radius from the ideal shooting position (EFSA, 2004), against 34.6% of the high pressure shots.

Instead, the likely explanation for cattle presenting less physical signs of imperfect stunning after being shot with high pressure lies in the greater kinetic energy that is transferred to cattle's head through the bolt (Table 2). According to Daly & Whittington (1989), it is the kinetic energy transmitted to the cranium by the bolt that produces insensibility. In spite of the lower values of kinetic energy found for low pressure on this study, it is still in conformity with some author's recommendations, e.g. according to Blackmore (1985), the kinetic energy required to penetrate the head of adult European breed cattle was 127 Joules, less than the recommendation presented by the Human Slaughter Association (1999), which states that an impact energy of at least 200 joules is necessary for an effective stun in adult cattle.

The kinetic energy delivered to the head during CBG stunning is affected to a much greater extent by variation in the velocity of the captive bolt as opposed to the mass of the bolt (Gibson et al., 2015). As reported by Gregory (2005) and Grandin (2013), the recommended minimum bolt velocity for *Bos taurus* steers, heifers, and cull cows is generally not less than 55 m.s⁻¹, and 70 m.s⁻¹ for stunning young and mature bulls (Gregory, 2007; Grandin, 2013). In this study, the highest value of mean peak velocity of the bolt occurred with the high pressure treatment (54.6 m.s⁻¹), being not enough to reach the recommended minimum velocity.

Despite its relevance to stunning, kinetic energy and head damage are not always correlated, since damage is not only due to energy transfer, but also to mechanical stress in the tissue (Koene, Boufker, & Papy, 2008). Therefore, considering the requirements for

head penetration by captive bolt, other physical parameters such as momentum and energy density should be taken into account.

The transfer of momentum from the bolt to the skull plays a crucial role when trying to achieve penetration. Since the penetrating bolt should have a small mass and a high velocity, it must result in an ultrashort time span during which the bolt is acting upon the skull. According to Karger (1995), because of inertia, the skull as a whole will not essentially move during transfer of impulse. Instead, during impact there will be a high transfer of momentum and energy locally, but no direct load on the entire skull. The result is the perforation of the skull without acceleration of the head. In humans, the most common forces involved in concussive traumatic brain injury are acceleration/deceleration of the freely moving head, resulting in rotational damage to the brain (Gibson et al., 2009). However, in cattle, the relatively large and immobile head supported by significant musculature reduces acceleration and deceleration (Finnie 1995; 1997). The highest value of momentum found on this work occurred when shooting with high airline pressure (Table 3).

In this study, the mean values of energy density (amount of energy that can be stored in a given mass of a system) of the captive bolt, for the three airline pressure tested (Table 3), were higher than the energy density measurements required for causing penetrating wounds at any human anatomical region (Bir, Stewart, & Wilhelm, 2005). However, there are no studies evaluating the minimum requirements of momentum or energy density of the captive bolt that leads to head penetration and effective stun in livestock species.

With regards to the physical signs, this study showed that when cattle were shot with high airline pressure they presented fewer signs indicating imperfect stunning, such as rhythmic respiration (see Table 1 at *GR*). According to Gregory (2007), this sign indicates that the

medulla in the brain and also the spinal cord plus nerves (which control breathing movements in the body) are still functioning. When rhythmic respiration is present it is important that the animal is immediately restunned in the correct position (Grandin, 2013).

5. Conclusions

Despite the airline pressures tested in this study being in accordance with the operating airline range recommended by the manufacturer, it is concluded that airline pressures below 190 *psi* are inappropriate when shooting adult Zebu beef cattle with pneumatically powered penetrating captive bolt guns. Due to insufficient information in the published literature about the physical parameters of penetrating captive bolts needed to stun adult beef cattle and the level of brain lesion resulted from bolt penetration according to the airline pressure, further research is required to improve the efficiency of cattle stunning and prevent suffering.

6. References

- Atkinson, S., Velarde, A., & Algers, B. (2013). Assessment of stun quality at commercial slaughter in cattle shot with captive bolt. *Animal Welfare*, 22, 473–481.
- Bir, C. A., Stewart, S. J., & Wilhelm, M. (2005). Skin penetration assessment of less lethal kinetic energy munitions. *Journal of Forensic Science*, 50, 1426-1429.
- Blackmore, D. K. (1985). Energy requirements for the penetration of heads of domestic stock and the development of a multiple projectile. *Journal of the British Veterinary Association*, 116, 36-40.
- Bourguet, C., Deiss, V., Tannugi, C. C., & Terlouw, E. M. C. (2011). Behavioural and physiological reactions of cattle in a commercial abattoir: Relationships with organisational aspects of the abattoir and animal characteristics. *Meat Science*, 88, 158–168.

- Daly, C. C., & Whittington, P. E. (1989). Investigation into the principal determinants of effective captive bolt stunning of sheep. *Research in Veterinary Science*, *46*, 406-408.
- Dörfler, K., Troeger, k., Lücker, E., Schönekeß, H., & Frank, M. (2014). Determination of impact parameters and efficiency of 6.8/15 caliber captive bolt guns. *International Journal of Legal Medicine*, *128*, 641-646.
- EFSA, The EFSA Journal (2004). Welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals; *Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals*, *45*, 1-29.
- Finnie, J. W. (1995). Neuropathological changes produced by non-penetrating percussive captive bolt stunning of cattle. *New Zealand Veterinary Journal* *43*, 183–185.
- Finnie, J. W. (1997). Traumatic head injury in ruminant livestock. *Australian Veterinary Journal* *75*, 204–208.
- Gibson, T. J., Johnson, C. B., Murrell, J. C., Mitchinson, S. L., Stafford, K. J., & Mellor, D. J. (2009). Electroencephalographic responses to concussive non-penetrative captive-bolt stunning in halothane-anaesthetised calves. *New Zealand Veterinary Journal*, *57*, 90-95.
- Gibson, T. J., Mason, C. W., Spence, J. Y., Barker, H., & Gregory, N. G. (2015). Factors affecting penetrating captive bolt gun performance. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, *18*, 222-238.
- Grandin, T. (2013). Making slaughterhouses more humane for cattle, pigs, and sheep. *Annual Review of Animal Biosciences*, *1*, 491-512.
- Gregory, N. G. (2005). Recent concerns about stunning and slaughter. *Meat Science*, *70*, 481–491.

Gregory, N. G., Lee, C. J., & Widdicombe, J. P. (2007). Depth of concussion in cattle shot by penetrating captive bolt. *Meat Science*, 77, 499-503.

Gregory, N. G. (2007). Stunning and slaughter. In N. G. Gregory (Ed.), *Animal Welfare and Meat Science*, 2nd edition (pp. 191–212). Wallingford, UK: CAB Publishing.

HSA, Humane Slaughter Association (1999). *Humane killing of livestock using firearms*. (Guidance notes n. 3, p. 11). Wheathampstead: Humane Slaughter Association, The Old School, Brewhouse Mill.

Karger, B. (1995). Penetrating gunshots to the head and lack of immediate incapacitation. I. Wound ballistics and mechanisms of incapacitation. *International Journal of Legal Medicine*, 108, 53-61.

Kneubuehl, B. P., Coupland, R. M., Rothschild, M. A., & Thali, M. J. (2011). *Wound Ballistics, Basics and Applications*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, p. 4.

Koene, B., Boufker, F., & Papy, A. (2008). Kinetic Non-Lethal Weapons. In T. Hupkens, & H. Monsuur (Eds.), *Netherlands Annual Review of Military Studies. Sensors, weapons, C4L and operations Research* (pp. 9-24). Netherlands: T.M.C. Asser Press.

Schepens, B., & Drew, T. (2004). Independent and convergent signals from the pontomedullary reticular formation contribute to the control of posture and movement during reaching in the cat. *Journal of Neurophysiology*, 92, 2217–2238.

Sturges, B. K. (2005). Neuro-ophthalmology: The visible nervous system. *Proceedings of the 2nd Annual Veterinary Neurology Symposium*. Davis, USA: University of California.

Terlouw, C., Bourguet, C., & Deiss, V. (2016). Consciousness, unconsciousness and death in the context of slaughter. Part II. Evaluation methods. *Meat Science*, 118, 147-156.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO A SER SUBMETIDO A MEAT SCIENCE

Effects of high airline pressures in stunning cattle with pneumatically powered penetrating and non-penetrating captive bolt guns

Steffan Edward Octávio Oliveira ^{*a,b}, Neville George Gregory ^c, Filipe Antonio Dalla Costa ^{a,b}, Troy John Gibson ^c, Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa ^{a,b}

^a *Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 14.884-900 Jaboticabal, SP, Brazil*

^b *Grupo de Estudos e Pesquisas em Etologia e Ecologia Animal, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 14.884-900 Jaboticabal, SP, Brazil*

^c *Royal Veterinary College, University of London, United Kingdom*

*Corresponding author:

E-mail address: mpcosta@fcav.unesp.br (M. J. R. Paranhos da Costa).

Abstract

Efficiency of stunning was assessed in 455 cattle at two abattoirs. Cattle were distributed into two stunning treatments: Using pneumatically powered penetrating (PCB, N= 363) and non-penetrating captive bolt gun (NPCB, N=92). PCB gun was powered pneumatically with 190 *psi*, and NPCB gun within the range of 210-220 *psi*. Number of shots, collapse at the first shot and signs of consciousness were assessed. The signs of brain function (rhythmic respiration, corneal and palpebral reflex, eyeball rotation, response to nostril stimulation, tonic and clonic convulsion, tremor, righting reflex, tongue protrusion and masseter relaxation) were recorded after the animal had rolled out of the stunning pen (GR), just after being hoisted (HO) and at the bleeding rail (BL). Blood extravasation from mouth and nostrils after shooting and the position of the shots on the heads were recorded. Velocity of the captive bolt when fired in air and its physical parameters, such as momentum, kinetic energy, energy density and sectional density were calculated. Occurrence of two or more shots was more frequently observed for NPCB than PCB (29 vs. 12%, $P<0.001$), and cattle were more likely to collapse at first shot when using PCB than NPCB (99 vs. 91%, $P<0.002$). Eyeball rotation (5 vs. 1%, $P<0.001$) and righting reflex (7 vs. 1%, $P<0.001$) were higher for NPCB than PCB at GR. Some of NPCB cattle (2%) presented response to nostril stimulation while PCB did not ($P<0.001$). Tongue protrusion was more frequent for PCB than NPCB (61 vs. 36%, $P<0.001$) on BL. Rhythmic respiration was more frequently observed for NPCB than PCB at GR,

HO and BL. Frequency of shots at the ideal position were low for both NPCB and PCB (5.7 vs. 3.1%, $P=0.333$). Values of bolt physical parameters were significant higher ($P<0.001$) for PCB than NPCB for all variables. There was a reduction in the signs of effective stunning when using NPCB. Based on these results, the PCB method was more efficient than NPCB in stunning cattle.

Key words: Bolt velocity; Cattle slaughter; Consciousness signals; Rhythmic respiration; Stunning methods

1. Introduction

The use of captive bolt guns for stunning of domestic livestock is the most common method of euthanasia in abattoirs (Finnie 1997). This method can be achieved by using penetrating (PCB) and non-penetrating captive bolt guns (NPCB; Blackmore and Delaney, 1988). The basic principles behind its operation are the same for both methods and involve the transference of kinetic energy from the moving bolt to the brain (Farouk, 2013). However, there is difference regarding the mechanisms behind the way that these methods render the animal insensible.

Non-penetrating stunning causes fast angular acceleration of the head after the impact of the large bolt with the skull. Acceleration/deceleration forces impart large-momentum, rotational, and shear forces to the head and brain but relatively low kinetic energy (Ommaya et al., 2002). In quadrupeds, the long axes of the brain and spinal cord are parallel. This almost linear neuraxis may impede rotational shearing after non-penetrating stunning and render the animal much less vulnerable to concussion (Finnie, 2001). Besides that, the brain of many animals is better protected than that of humans by well-developed temporal muscles, and more extensive frontal sinuses. The hollow, domed, bony calvaria is resistant to considerable force, which diffuses over its surface and to the base (Summers, Cummings & Lahunta, 1995). Additionally, if the head is immobilized, the injury transmitted to the brain is much less than when the head is free (Crooks, 1991).

By contrast, with penetrating stunning, the movement of the head is reduced (Finnie et al., 2000), due to the smaller area of the head impacted by the smaller diameter bolt, deliver high focal kinetic energy and relatively low cranial momentum (Ommaya et al., 2002). The intention is to induce a deep and irreversible form of concussion (Gregory et al., 2007), since there is destruction of brain tissue in the permanent bolt wound track surrounded by a hemorrhagic zone (Finnie, 2016).

The most frequently used stunning equipment for cattle stunning in large beef abattoirs are either pneumatically powered non-penetrative or penetrative captive bolt guns (EFSA, 2013). These guns use compressed air as the potential energy when the gun is fired, which prevents energy to be wasted as heat as with cartridge powered guns (Oliveira, Gregory, Dalla Costa, Gibson, Paranhos da Costa, *in press*). Thus, the air pressure level in the gun's air chamber before shooting may affect the velocity of the bolt, the amount of kinetic energy delivered to the animal's head and, consequently, the efficiency of stunning. Therefore, the objective of this study was to assess the efficiency of non- and penetrating methods of stunning cattle using pneumatically powered captive bolt guns operating with high airline pressures.

2. Materials and methods

This project was approved by the Committee of Ethical Use of Animals (Protocol number: 022754/14).

2.1. Abattoirs description

The study was carried out during routine stunning and slaughter at two beef abattoirs belonging to the same company. Combined, both abattoirs slaughters approximately 1300 animals/day, mainly bulls (over 550 kg liveweight) and old cows (over 400 kg liveweight). The animals were individually restrained in a stunning pen equipped with a head yoke and then stunned by an experienced slaughterman with a pneumatically powered penetrating (PCB) or non-penetrating captive bolt gun (NPCB). After the animal have rolled out of the stunning pen, it was shackled and then hoisted onto a bleeding rail, where a third slaughterman stuck it by inserting a knife into the thoracic cavity. According to the user's manual provided by the manufacturer, the operating airline pressure of the guns used at both abattoirs is within a range of 160-190 *psi* for the penetrating (USSS-1, Jarvis Products Corporation[®]) and 190-245 *psi* for the non-penetrating gun (USSS-2A, Jarvis Products Corporation[®]). The abattoirs are regulated by the Brazilian Federal Inspection Service.

2.2. Animals and airline pressures

A total of 455 Zebu (pure, N=176) and crossbred (N=279) were distributed into two stunning treatments: Using penetrating captive bolt gun (PCB, N= 363) and non-penetrating captive bolt gun (NPCB, N=92). The levels of air pressure that powered the

pneumatic guns evaluated were: 190 *psi* for PCB and within the range of 210-220 *psi* for NPCB. The control and verification of the desired airline pressure was done through the pressurization system and manometers of each abattoir.

2.3. Assessment of physical signals of brain function

The state of consciousness and response to pain in stunned cattle were assessed by recording twelve physical signals in three different stages of the production line: with the animal on the ground, just after it had rolled out of the stunning pen (GR) and being hoisted (HO), and at the beginning of the bleeding rail (BL). A person, standing on the platform of the stunning pen, recorded the general information about the animals (breed, category, and gender), if they collapsed or not after the first shot (since cattle were held with head yoke it was said the animal collapsed if it loses its standing posture) and the interval between stunning and sticking. Another person recorded the physical signals of brain function at GR and HO, and a third person did it at BL. Shot accuracy was assessed at BL by placing a grid printed on transparent plastic onto the head of the shot cattle and measuring the deviation between the shot hole or the mark of the non-penetrating shot on the head and the ideal shooting position, defined by Gregory (2007) as the cross-over point between imaginary lines drawn between the base of each horn and the corner of the eye on the opposite side of the head.

The assessment of the physical signs (rhythmic respiration, corneal reflex, palpebral reflex, full eyeball rotation, response to nostril stimulation, tremor, righting reflex, tongue protrusion, masseter relaxation, blood extravasation, tonic convulsion and clonic convulsion) were carried out according to Oliveira, Gregory, Dalla Costa, Gibson, & Paranhos da Costa (2017).

2.4. Bolt velocity measurements and determination of physical parameters

The measurements of velocity of the captive bolt when it was fired in air, mass of the captive bolt and the calculation of its physical parameters (momentum, kinetic energy and energy density) was performed as described by Oliveira et al. (2017). The sectional density of the bolt, which is an important parameter influencing tissue penetration and correspond to the ratio of the bolt's mass to its cross-sectional area (calculated as the weight of the bolt, in pounds, divided by the square of the bolt's diameter, in fractions of an inch) was calculated. Before shooting the airline pressure was set to 190 *psi* for PCB and

220 *psi* for NPCB. Recorded data were stored through the velocity meter software for further analyses (2009 CBG Tester[®], Royal Veterinary College) of bolt velocity profile through the velocity meter and peak velocity.

2.5. *Statistical analysis*

Data were firstly submitted to an exploratory analysis and then analyzed by two-tailed Fisher Exact test with Graphpad software (2015 Graphpad Software, Inc) to verify the effect of the stunning method in the physical signals of brain function of cattle. The sampling unit was each individual animal. Multiple comparisons of the values of bolt velocities were performed using the Tukey-Kramer test using the shot as experimental unit, and the statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. *Physical signals of brain function*

There was a significant difference ($P < 0.001$) between NPCB and PCB in the number of cattle that collapsed at the first shot (91 vs. 99%, respectively). The frequency of cattle that received two or more shots was significantly higher ($P < 0.001$) when shot with NPCB than PCB (Table 1). For NPCB, eight shots were necessary to make one bull to collapse, and 31 of the consecutive shots were given even after the animal had already collapsed. Cattle shot with NPCB presented more physical signals related to incomplete stunning than PCB. At GR, cattle shot with NPCB showed a higher occurrence of righting reflex (7 vs. 1%, $P < 0.001$) and eyeball rotation (5 vs. 1%, $P < 0.001$) than PCB. Cattle shot with NPCB also presented less tongue protrusion (36 vs. 61%, $P < 0.001$) and more responses to nostril stimulation (2 vs. 0%, $P = 0.04$) than PCB at BL (Table1).

Table 1. Prevalence of physical signs of brain function in cattle after being shot with pneumatic non-penetrating captive bolt gun (NPCB, 210-220 *psi*) and penetrating captive bolt gun (PCB, 190 *psi*) assessed on the ground, just after the animal had rolled out of the stunning pen (GR), just after being hoisted (HO), and at the bleeding rail (BL).

Local of assessment and physical signals	NPCB (N=92) (% of occurrence)	PCB (N=363) (% of occurrence)
<i>Stunning pen</i>		
Two or more shots	29 ^a	12 ^b
<i>GR</i>		
Rhythmic respiration	12 ^a	8 ^a
Righting reflex	7 ^a	1 ^b
Tremor	29 ^a	28 ^a
Masseter relaxation	46 ^a	48 ^a
Tongue protrusion	13 ^a	12 ^a
Responding to nostril stimulation	2 ^a	3 ^a
Palpebral reflex – Corneal reflex	2 ^a	1 ^a
Eyeball rotation	5 ^a	1 ^b
Tonic convulsion	64 ^a	62 ^a
Clonic convulsion (score 1)	12 ^a	20 ^a
Clonic convulsion (score 2 or 3)	18 ^a	14 ^a
<i>HO</i>		
Rhythmic respiration	3 ^a	1 ^a
Righting reflex	18 ^a	16 ^a
Tremor	1 ^b	6 ^a
Tongue protrusion	47 ^a	46 ^a
Blood extravasation	12 ^b	22 ^a
Tonic convulsion	0 ^a	0.3 ^a
Clonic convulsion (score 1)	26 ^a	34 ^a
Clonic convulsion (score 2 or 3)	30 ^a	25 ^a
<i>BL</i>		
Rhythmic respiration	4 ^a	2 ^a
Righting reflex	1 ^a	3 ^a
Tremor	2 ^a	4 ^a
Tongue protrusion	36 ^b	61 ^a
Responding to nostril stimulation	2 ^a	0 ^b
Clonic convulsion (score 1)	9 ^a	9 ^a
Clonic convulsion (score 2 or 3)	1 ^a	6 ^a

Means in a row without a common superscript letter were significantly different (P<0.05)

3.2. Shooting accuracy

The frequency of shots at the ideal position were low for both NPCB and PCB (Table 2), and the percentage of shots that deviated more than two centimeters radius from that position were also high for both methods (72.7 vs. 65.4%, respectively).

Table 2. Frequency of shots at the ideal shooting position in cattle heads and the deviation in cm from that position, when shot with pneumatically powered non-penetrating captive bolt gun (NPCB, 210-220 *psi*) and with pneumatic penetrating captive bolt gun (PCB, 190 *psi*).

Shot deviation from ideal shooting position (cm)	NPCB (N=88) (% of shots)	PCB (N=353) (% of shots)	<i>P</i>
Ideal shooting position	5.7	3.1	0.333
1	5.7	12.4	0.087
2	15.9	19.2	0.542
3	28.4	19.8	0.083
4	14.8	18.1	0.532
5	11.4	11.9	1.000
6	8	8.8	1.000
7	5.6	5.1	0.790
8	4.5	1.4	0.082
9	0	0.3	1.000

3.3. Bolt physical parameters

Table 3 shows that the values of mean peak bolt velocity, momentum, kinetic energy, energy density and sectional density were significant higher ($P < 0.001$) for PCB than NPCB.

Table 3. Mean values (\pm SD) of recorded bolt velocity and calculated values of momentum, kinetic energy, energy density and sectional density according to the stunning method.

Stunning method	Number of shots	Bolt weight (kg)	Mean peak bolt velocity \pm SD (m/s)	Momentum \pm SD (Ns)	Kinetic energy \pm SD (J)	Energy density \pm SD (J/mm ²)	Sectional density (wt/diam ²)
NPCB (220 <i>psi</i>)	10	0.828	18.1 ^b \pm 0.19	14.9 ^b \pm 0.16	135 ^b \pm 2.85	0.14 ^b \pm 0.003	0.97
PCB (190 <i>psi</i>)	21	0.297	54.6 ^a \pm 1.33	16.2 ^a \pm 0.39	448 ^a \pm 22.02	2.3 ^a \pm 0.11	1.64

Figure 1 is the mean velocity profiles of the captive bolt guns for the two stunning methods. The measurements for bolt velocity along the velocity meter showed a significant variation in velocity profile and peak velocity between the captive bolt gun types. This occurred when the bolt transected the fourth infrared LED, which was positioned 16 mm from the top of the velocity meter. The distance from the recessed bolt to this sensor was 104 mm. After this point, the velocity of NPCB had a great drop, whereas the PCB ended its travel with a mean velocity of 35.9 m/s. At 96 mm of bolt travel, which represents the impact moment of the bolt against the animals' head (Figure 1), the mean velocity of the captive bolt for PCB gun was 31.14 \pm 0.45 m/s (144 joules of kinetic energy), while for the NPCB it was 13.39 \pm 0.15 m/s (74 joules of kinetic energy).

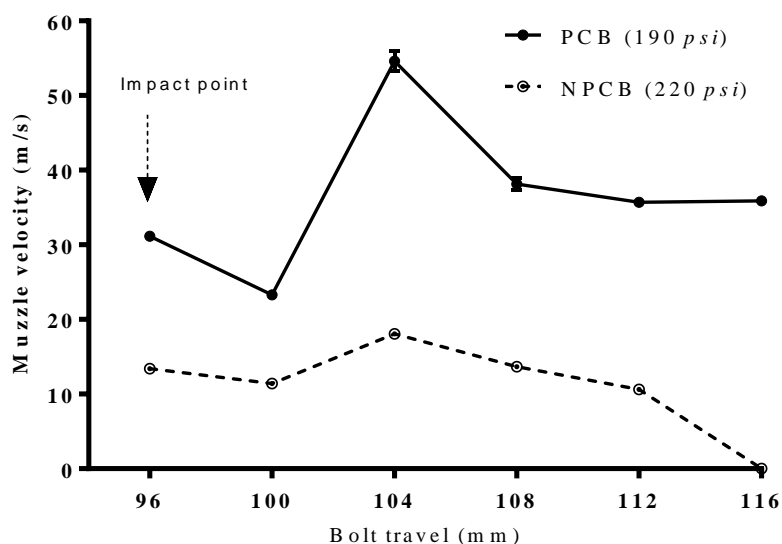


Figure 1. Bolt velocity profile according to gun type.

4. Discussion

Mechanical stunning of animals for slaughter is achieved by using penetrating and non-penetrating captive bolt guns (Blackmore and Delaney, 1988). Comparing the two methods, The opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (EFSA, 2004) stated that penetrating captive bolt stunning has several animal welfare advantages over non-penetrating captive bolt stunning (such as success rate and duration of unconsciousness) and, if properly used, results in an effective stun. On the other hand, the non-penetrating captive bolt stunning (percussive stunning) requires greater accuracy, control of recoil and contact of the gun with the head.

For both methods, the basic principles are the same and involve the transference of kinetic energy from the bolt to the brain (Farouk, 2013). The result may be neuronal destruction, caused by bolt penetration through the brain and/or neuronal dysfunction, achieved as a consequence of a sudden direct blow of a wider bolt to the head. Pneumatically powered captive bolt guns use compressed air as potential energy when the gun is fired, which is converted into kinetic energy of the moving bolt. Although the PCB and NPCB were operating with high levels of airline pressure, the results found on this study demonstrate the importance of choosing penetrating instead of non-penetrating captive bolt guns when stunning adult cattle, since there were fewer signs of imperfect stunning.

The likely explanation for cattle shot with PCB have presented fewer signs of imperfect stunning lies on the amount of kinetic energy transmitted by the bolt to the cattle's cranium and physical damage to particular brain structures, such as the brainstem (Oliveira et al., 2017 *in preparation*) . According to Hampton et al. (2016), the kinetic energy delivered is of critical importance for the capacity of physical killing methods to induce instantaneous insensibility, and, as stated by Gibson et al (2015), the kinetic energy delivered to the head during stunning is affected to a much greater extent by variation in the velocity of the captive bolt as opposed to the mass of the bolt.

In the study, due to the lower value of mean peak bolt velocity recorded for NPCB (18.1 m.s⁻¹), the calculated average of kinetic energy found for this method was very low when compared to PCB (Table 3), even less than the recommended by the Human Slaughter Association (1999), which states that an impact energy of at least 200 joules is necessary for an effective stun in adult cattle.

One important sign related to effective stunning and used as an indicator of the potential loss of consciousness is the collapse of the animal immediately after the first shot (Terlouw, 2016). When shooting with NPCB, the impact of the blunt bolt with the skull when implemented at the frontal position of the head should be enough to induce a concussion of the brain and consequently unconsciousness (EFSA, 2013). Thus, effectively shot cattle should collapse immediately after the impact of the bolt, among others reasons that occurs due to damage to the reticular formation that plays a role in maintaining posture (Laureys and Tononi, 2009). However, in the study a higher proportion of cattle failed to collapse at the first shot when shot with NPCB than PCB (9 vs. 1%, $P = 0.0002$). Moreover, for NPCB, eight shots were necessary to make one bull to collapse.

Cattle shot with NPCB showed a higher occurrence of righting reflex when compared to PCB (7 vs. 1%, $P < 0.001$). An animal on the floor that is conscious following an unsuccessful stun may attempt to lift the head and/or body, or at least to position them in the usual angle. After an effective stun, as long as the animal is unconscious, it does not attempt to recover its normal posture (Terlouw et al., 2016).

Another sign that indicates that there is a risk of a shallower depth of unconsciousness or a return of consciousness is the presence of eyeball rotation (Atkinson et al., 2013; Gregory et al., 2007). However, it is important to consider the degree of the

eyeball rotation, since one study showed that the presence of a full rotation required a second stun, while a partial rotation required increased monitoring of the animal (Atkinson et al., 2013). On this study, cattle shot with NPCB showed higher occurrence of full eyeball rotation (5 vs. 1%, $P < 0.001$) than PCB.

Unconscious animals will show general loss of muscle tone, which can be recognized from the relaxed jaws with protruding tongue (EFSA, 2013). The incidence of tongue protrusion when cattle were hung on the bleed rail on this study was higher when using PCB (61 vs. 36%, $P < 0.001$) than NPCB. Some authors do not fully agree whether or not tongue protrusion is a useful indicator of depth of concussion. For Grandin (2002), if there is tongue protrusion, with the tongue fully extended, limp, and flaccid, the animal can be considered properly stunned and insensible. On the other hand, Gregory (2007) concluded that tongue protrusion whilst suspended from the bleeding rail was not a useful indicator of depth of concussion produced by a shot, but evidently it indicates that the jaw muscles are relaxed and this is a potential sign of unconsciousness at the time the assessment is made.

A valuable indicative of consciousness is the pain withdrawal reflex, a polysynaptic reflex that involves activation of nociceptors and is used to assess unconsciousness (Anil, 1991; Erasmus et al., 2010). Among other pain withdrawal reflexes, the response to nostril stimulation (elicited by a painful stimulus to the cattle nostril after stunning and/or bleeding) was highly valued in a survey on expert opinion as an indicator to assess unconsciousness after all types of stunning (Gerritzen and Hindle, 2009). The results found on this study showed a higher occurrence of cattle responding to nostril stimulation when shot with NPCB (2 vs. 0%, $P < 0.001$) than PCB at the bleeding rail. Neves et al. (2016) found similar results comparing slaughter without stunning by shechita 60 seconds after bleeding with PCB (3 vs. 0%, $P < 0.05$). Verhoeven et al. (2016) observed that for calves slaughtered without stunning only the withdrawal of the nose was observed after the neck cut.

5. Conclusion

Based on the results of this study, the use of non-penetrating captive bolt gun for stunning of adult cattle may increase the risk of cattle suffering at slaughter. Despite the non- and penetrating captive bolt guns were operating with high levels of airline pressure,

presumably the non-penetrating gun was not working properly, reason why it showed low values of peak bolt velocity, momentum and kinetic energy. Thus, it is extremely important to perform maintenance of the guns in order to ensure its good performance and prevent animal suffering.

6. References

Anil, M., McKinstry, J. (1991). Reflexes and loss of sensibility following head-to-back electrical stunning in sheep. *The Veterinary Record*, 128, 106–107.

Atkinson, S., Velarde, A., Algers, B. (2013). Assessment of stun quality at commercial slaughter in cattle shot with captive bolt. *Animal Welfare*, 22, 473–481.

Blackmore, D. K., Delaney, M. W. (1988). Slaughter of stock. Publication no. 18. Foundation for Continuing Education of The N.Z. Veterinary Association, Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Crooks, D.A. (1991). The pathological concept of diffuse axonal injury; its pathogenesis and the assessment of severity. *Journal of Pathology*, 165, 5-10.

Erasmus, M.A., Turner, P.V., Widowski, T.M. (2010). Measures of insensibility used to determine effective stunning and killing of poultry. *Journal of Applied Poultry Research*, 19, 288–298.

EFSA, European Food Safety Authority (2004). Welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals. *The EFSA Journal*, 45, 1–29.

EFSA, European Food Safety Authority. (2013). Scientific Opinion on monitoring procedures at slaughterhouses for bovines. *The EFSA Journal*, 11(12), 1-65.

Farouk, M. M. (2013). Advances in the industrial production of halal and kosher red meat. *Meat Science*, 95, 805-820.

Finnie J. W., Blumbergs P. C., Manavis J. (2000) Evaluation of brain damage resulting from penetrating and non-penetrating captive bolt stunning using lambs. *Australian Veterinary Journal*, 78, 775–778.

Finnie, J.W. (2001). Animal models of traumatic brain injury: a review. *Australian Veterinary Journal*, 79, 628–633.

Finnie, J. W. (2016). Forensic Pathology of Traumatic Brain Injury. *Veterinary Pathology*, 53, 962-978.

Gerritzen, M.A., Hindle, V.A. (2009). Indicatoren voor bewusteloosheid. Wageningen UR Livestock Research. Retrieved November 1, 2013, from <http://edepot.wur.nl/12436>

Gibson, T. J., Mason, C. W., Spence, J. Y., Barker, H., Gregory, N. G. (2015). Factors affecting penetrating captive bolt gun performance. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 18, 222-238.

Grandin, T. (2002). Return-to-sensibility problems after penetrating captive bolt stunning of cattle in commercial beef slaughter plants. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221, 1258-1261.

Gregory, N. G., Lee, C. J., Widdicombe, J. P. (2007). Depth of concussion in cattle shot by penetrating captive bolt. *Meat Science*, 77, 499–503.

Hampton, J. O., Adams, P. J., Forsyth, D. M., Cowled, B. D., Stuart, I. G., Hyndman, T. H., Collins, T. (2016). Improving Animal Welfare in Wildlife Shooting: The Importance of Projectile Energy. *Wildlife Society Bulletin*, 1-9. doi: 10.1002/wsb.705.

HSA, Humane Slaughter Association (1999). Humane killing of livestock using firearms. (Guidance notes n. 3, p. 11). Wheathampstead: Humane Slaughter Association, The Old School, Brewhouse Mill.

Laureys, S., Tononi, G. (2009). The neurology of consciousness: cognitive neuroscience and neuropathology, 1st edition. Academic Press, London, UK.

Neves, J. E. G., Paranhos da Costa, M. J. R., Roça, R. O., Faucitano, L., Gregory, N. G. (2016). A note comparing the welfare of Zebu cattle following three stunning-slaughter methods. *Meat Science*, 117, 41-43.

Ommaya, A.K., Goldsmith, W., Thibault, L. (2002). Biomechanics and neuropathology of adult and pediatric head injury. *British Journal of Neurosurgery*, 19, 843–853.

Summers, B.A., Cummings, J.F., deLahunta, A. (1995). *Veterinary Neuropathology*. St Louis, MO: Mosby, Elsevier.

Terlouw, C., Bourguet, C., Deiss, V. (2016). Consciousness, unconsciousness and death in the context of slaughter. Part II. Evaluation methods. *Meat Science*, 118, 147-156. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.010>.

Verhoeven, M. T. W., Gerritzen, M. A., Hellebrekers, L. J., Kemp, B. (2016). Validation of indicators used to assess unconsciousness in veal calves at slaughter. *Animal*, 10, 1457-1465.

CAPÍTULO 4 – ARTIGO A SER SUBMETIDO (PERIÓDICO NÃO DEFINIDO)

Evaluation of brain damage resulting from penetrating and non-penetrating stunning of Nelore Cattle using pneumatically powered captive bolt guns

Steffan Edward Octávio Oliveira^{a,b}, Neville George Gregory^c, Filipe Antonio Dalla Costa^{a,b}, Troy John Gibson^c, Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa^{*a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 14.884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

^b Grupo de Estudos e Pesquisas em Etologia e Ecologia Animal, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 14.884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

^c Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

*Corresponding author:

E-mail address: mpcosta@fcav.unesp.br

ABSTRACT

Brain damage resulting from penetrating and non-penetrating stunning of cattle using pneumatically powered captive bolt guns was evaluated. Forty-two heads of adult Nelore cattle were assessed. The treatments were the same as the methods used in commercial abattoirs and they compared the level of airline pressure that powered the pneumatic captive bolt guns, as follows: Penetrating captive bolt gun operating with 160 *psi* (P1; n=10), 175 *psi* (P2; n=10), 190 *psi* (P3; n=12), and non-penetrating captive bolt gun operating with 220 *psi* (NP; n=10). Skin and bone thickness, bolt penetration angle, bolt penetration depth and hemorrhage over the cerebral hemispheres were assessed. Heads were examined for presence of hemorrhage and/or laceration made by the bolt in the frontal lobes, parietal lobes, temporal lobes, occipital lobes, cerebellum, hypothalamus, midbrain, pons, medulla, third ventricle and lateral ventricles. The results showed that only P1 had shots that failed to perforate the skull (n=2; 20%). The bolt penetration depth and hemorrhage over the cerebral hemispheres was significantly ($P \leq 0.05$) greater when shooting with P3. Presence of subarachnoid hemorrhage (which was present as at least a single blood clot) over the frontal, parietal, temporal and occipital lobes was higher for NP. For P1 and P2, lacerations were observed only in the frontal and parietal lobes, and were restricted to the cortical region. Subarachnoid hemorrhage surrounding the brainstem structures (including medulla) was only found for P3. Only P3 caused laceration in the midbrain and pons. Neither hemorrhage nor laceration were observed on the brainstem structures of heads shot with NP. Thus, shooting adult Nelore cattle with a pneumatically powered penetrating captive bolt gun operating with 190 *psi* is more effective when trying to achieve unconsciousness by damaging the brainstem.

1. Introduction

Captive bolt guns are the most common devices used for stunning of cattle prior to slaughtering in abattoirs. Both non- and penetrating captive bolt guns are used. Non-penetrating method is mainly used for halal slaughter, while the penetrating method is used

prior to non-religious slaughter, and there is differences regarding the way that these methods render the animal insensible.

Shooting with a non-penetrating gun causes acceleration and deceleration forces, which impart rotational and shear forces to the head and brain (Ommaya, Goldsmith & Thibault, 2002). Most brain damage caused by this method occurs from the effects of head movements, particularly angular or rotational acceleration, rather than the impact alone (Finnie, 1997). The concussion induces neuronal depolarization in the cerebral hemispheres and, depending on the magnitude of the impact, the brainstem (Gregory, 1998a; Posner, Saper, Schiff, & Plum, 2008). The shock wave created by the impact of a large bolt against the cranium can push the brain tissue through the opening of the tentorium, compressing the brainstem, which may cause slowing or cessation of breathing and cardiac function (Carey, Sarna, Farrell, & Happel, 1989). If the lesion disrupts the functioning of the brainstem, the cortex does not function (Brown, Basheer, McKenna, Strecker, & McCarley, 2012) and the animal becomes unconscious.

The penetrating method is designed to cause a combination of concussion of the skull and destruction of brain tissue. The impact causes a shockwave through the brain provoking pressure gradients leading to tears and lesions in the brain tissue and disturbances in the blood flow (Posner et al., 2008). Following penetration, skin and bone fragments can act as secondary missiles, which can cause further damage to the brain (Gibson et al., 2012), crushing tissues and blood vessels (Viel, Schroder, Puschel, & Braun, 2009). When the bolt retracts, it leaves a temporary void in the cavity created by its passage, which promotes further tearing of axons and blood vessels (Karger, 1995). This latter effect may be strengthened by increased cranial pressure due to hemorrhage (Gibson et al., 2012). Since there is hemorrhage, there will be deprivation of blood supply and, in this situation, the brain would be starved of oxygen and unconsciousness would be sustained (Gregory, 1998b).

The penetrating bolt should be oriented towards the brainstem, since the vital functions, such as breathing and cardiovascular activity are regulated by this structure (Laureys, 2005b). Thus, if brain damage is insufficient, or the bolt does not reach the relevant structures, either because of insufficient penetration depth, placement or orientation, the animal may remain conscious or show a shallow depth of concussion.

Pneumatically powered captive bolt guns are the most frequently used equipment for stunning cattle in large Brazilian beef abattoirs (EFSA, 2013). These guns use compressed air as source of energy when the gun is fired, which minimize energy to be wasted as heat as occurs with cartridge powered guns. Since the air pressure level in the gun's air chamber before shooting affects the velocity of the bolt and the amount of energy transferred to the skull (Oliveira, Gregory, Dalla Costa, Gibson, Paranhos da Costa, *in press*), it could influence the severity of brain lesions and, consequently, the efficiency of stunning. Accordingly, the bolt penetration depth into the deeper structures in the brain could also be affected.

The aim of this study was to evaluate brain damage resulting from penetrating and non-penetrating stunning of cattle using pneumatically powered captive bolt guns.

2. Materials and methods

This research was carried out in accordance with the Brazilian legislation, being approved by the Committee for the Ethical Use of Animals from Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences of São Paulo State University (Protocol n. 022754/14), Jaboticabal, SP, Brazil. Forty-two adult Nelore Cattle were slaughtered in a Brazilian commercial abattoir. Firstly, the animals were individually restrained in a stunning pen equipped with a head yoke and then stunned by an experienced slaughterman. Thirty-two cattle were shot with pneumatically powered penetrating captive bolt gun (PCB; USSS-1, JARVIS® Jarvis Products Corporation; Middletown, CT, USA) and ten were stunned with pneumatically powered non-penetrating captive bolt gun (NPCB; USSS-2A, JARVIS® Jarvis Products Corporation; Middletown, CT, USA). The tested guns and levels of airline pressure (that powered it) are commonly used in beef slaughterhouses in Brazil.

The penetrating gun was tested with three airline pressures, 160 *psi* (P1, n = 10), 175 *psi* (P2, n = 10) and 190 *psi* (P3, n = 12). For the non-penetrating method (NP) one level of airline pressure was tested (220 *psi*, n=10). According to the user's manual provided by the manufacturer, the operating airline pressure of the guns used at the abattoir is within a range of 160–190 *psi* for PCB and 190–245 *psi* for NPCB. The abattoir is monitored by the Brazilian Federal Veterinary Service.

Shots were aimed at the ideal shooting position, which was defined as the cross-over point between imaginary lines drawn between the base of each horn and the corner of the eye on the opposite side of the head (Gregory, 1998b). After bleeding, the skinned heads of the shot cattle were identified with matching paint marks in order to facilitate its tracking inside the abattoir. Heads were stored in labeled plastic bags and then moved to the freezing tunnel, where they remained for five hours at -45 C°.

Frozen heads were band sawed at the Laboratory of Anatomy (*São Paulo State University*) with the cut passing longitudinally through the bolt hole for PCB or through the depressed shot spot for NPCB. The jaw were removed beforehand in order to reduce wear of the saw. The trajectory and penetration depth of the PCB were measured from the outer surface of the head using a plastic probe inserted through the bolt entrance cavity. Heads were examined for skin tissue and bone thicknesses with a digital Vernier caliper at the bolt entrance site and the angle of penetration was measured with a steel protractor inserted into the bolt wound cavity in the brain.

After defrosting, the cerebral hemispheres were removed from the cranial vaults for examination of gross lesions, according to the brain structures (frontal lobes, parietal lobes, temporal lobes, occipital lobes, cerebellum, hypothalamus, midbrain, pons, medulla, third ventricle and lateral ventricles) and type of damage (hemorrhage, identified by the presence of blood outside the vessels due to physical damage to the vascular wall; laceration, described as a brain injury from the bolt that causes loss of its anatomical architecture and destruction of brain mass). Hemorrhage over the brain was assessed subjectively as a percentage of total surface area of each brain hemisphere.

For the nominal qualitative variables, the Fisher's Exact Test was used to compare the captive bolt guns and the airline pressures tested. Whenever the test detected a significant effect ($P \leq 0.05$) of treatment, the analysis was performed by comparing the treatments two by two. In the case of the quantitative variables (interval of ratio scales), the Kruskal–Walis test was used to compare the treatments.

3. Results

Comparing the penetrating treatments, only P1 had shots that failed to perforate the skull (n=2; 20%). In those cases, only the outer table of the cranial bone was completely

perforated, with depressed fracture of the inner table (Figure 1a). The bolt entrance wound in the skulls were a uniform round hole with approximately 16 mm in diameter with radiating fracture lines observed on outer and inner table of the skull. There was no significant difference for skin and bone thickness or bolt penetration angle among the heads shot with P1, P2 or P3. However, the skin and bone thickness was significantly ($P = 0.05$) thinner for heads shot with NP. The bolt penetration depth was significantly ($P \leq 0.05$) deeper when shooting with the highest airline pressure tested (P3, 190 *psi*; Table 1).

Table 1. Means \pm SD of skin and bone thickness, bolt penetration angle, bolt penetration depth and hemorrhage over the left and right hemisphere of the brain according to method of stunning and airline pressure.

	P1 (N=10)	P2 (N=10)	P3 (N=12)	NP (N=10)	<i>P</i>
Skin and bone thickness (mm)	16.17 \pm 0.48	17.19 \pm 0.94	18.43 \pm 1.06	15.95 \pm 0.47	0.05
Bolt penetration angle ($^{\circ}$)	80.00 \pm 13.6	100.00 \pm 2.36	96.33 \pm 3.57	–	0.66
Bolt penetration depth (cm)	4.77 \pm 0.84	7.84 \pm 0.25	10.65 \pm 0.54	–	<0.001
Hemorrhage over left hemisphere (%)	15.00 \pm 2.79	23.00 \pm 3.51	35.83 \pm 6.36	19.00 \pm 3.79	0.06
Hemorrhage over right hemisphere (%)	24.5 \pm 3.83	27.00 \pm 2.91	58.75 \pm 6.52	25.00 \pm 2.58	0.001

P value ≤ 0.05 differed significantly between treatments according to Kruskal Wallis's test
 Penetrating method: P1=160 *psi*; P2=175 *psi*; P3=190 *psi*
 Non-penetrating method: NP=220 *psi*
 Hemorrhage: (%) of total surface area

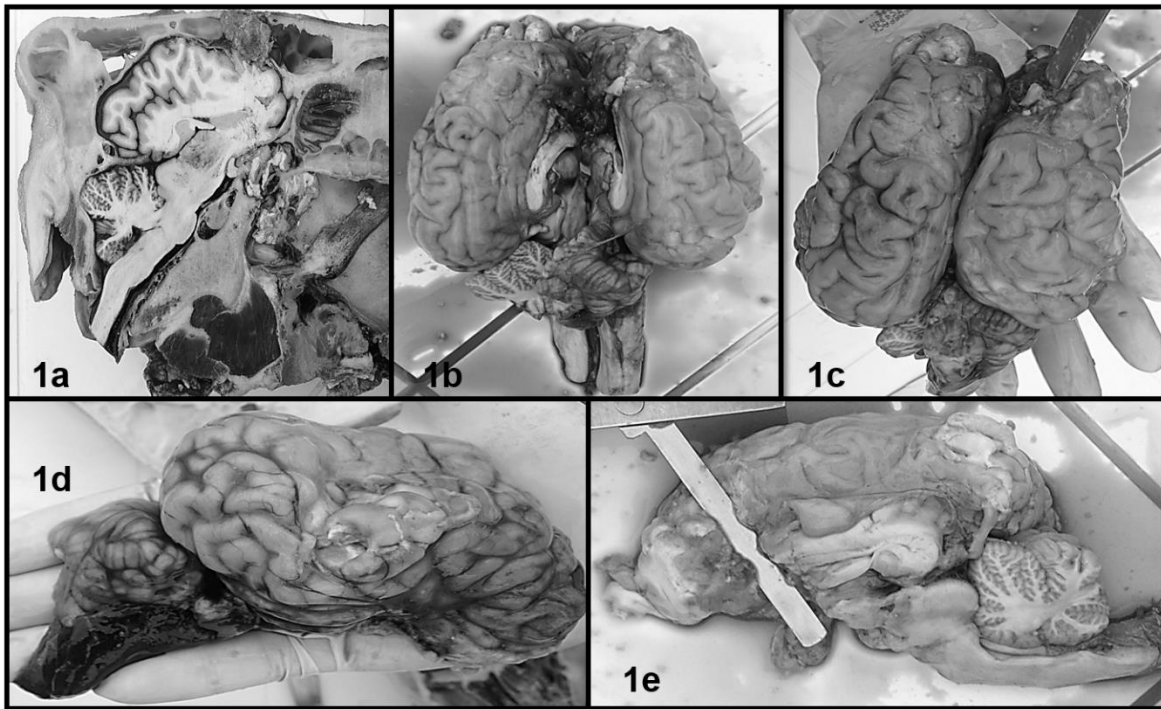


Figure 1. Adult male Nelore cattle: Shot that failed to reach the brain when shooting with PCB gun operating with 160 *psi* (1a). Ventral and superior aspect of the brain showing frontal lobe laceration when shot with PCB gun operating with 160 *psi* (1b and 1c). Right cerebral hemisphere showing abundant subarachnoid hemorrhage around the brainstem when shot with PCB gun operating with 190 *psi* (1d). Protractor inserted into the bolt wound cavity in the right cerebral hemisphere highlighting laceration reaching the hypothalamus of a head shot with PCB gun operating with 190 *psi* (1e).

Comparing the methods, the number of heads that presented subarachnoid hemorrhage (at least a single blood clot) over the frontal, parietal, temporal and occipital lobes was higher for NP than any of the penetrating airline pressures tested (Table 2). However, hemorrhage over the total cerebral hemispheres was higher for P3, with a significant difference between the stunning methods and airline pressure tested for the right hemisphere (Table 1). For both P1 and P2, laceration was observed only on the frontal and parietal lobes, but not extending deeply into the basal ganglia and thalamus. For P2, one head presented laceration on the lateral ventricle and three presented intraventricular hemorrhage (Table 2). Laceration of hypothalamus was only found for P3 (Figure 1e).

Table 2. Absolute and relative frequencies of cattle with hemorrhage and laceration according to the brain structures during *post mortem* examination in function of the stunning method and airline pressure.

Region of damage	Hemorrhage – [Laceration]			
	P1 (%) n=10	P2 (%) n=10	P3 (%) n=12	NP (%) n=10
<i>Cerebrums</i>				
Frontal lobes	7 (70) – [8 (80)]	3 (30) – [7 (70)]	2 (16.7) – [2 (16.7)]	9 (90) – [0]
Parietal lobes	1 (10) – [2 (20)]	1 (10) – [2 (20)]	2 (16.7) – [2 (16.7)]	6 (60) – [0]
Temporal lobes	3 (30) – [0]	1 (10) – [0]	2 (16.7) – [0]	4 (40) – [0]
Occipital lobes	0 – [0]	0 – [0]	1 (8.3) – [0]	7 (70) – [0]
<i>Ventricles</i>				
Lateral ventricles	3 (30) – [0]	3 (30) – [1 (10)]	5 (41.7) – [2 (16.7)]	4 (40) – [0]
Third ventricle	2 (20) – [0]	3 (30) – [0]	5 (41.7) – [2 (16.7)]	2 (20) – [0]
Hypothalamus	1 (10) – [0]	0 – [0]	7 (58.3) – [2 (16.7)]	1 (10) – [0]
Cerebellum	1 (10) – [0]	0 – [0]	2 (16.7) – [0]	2 (20) – [0]

Penetrating method: P1=160 *psi*; P2=175 *psi*; P3=190 *psi*

Non-penetrating method: NP=220 *psi*

Hemorrhage: Subarachnoid Hemorrhage, recognized when at least one single blood clot was observed

Hemorrhage over the brainstem structures was more frequent for P3. Additionally, abundant subarachnoid hemorrhage that completely surrounded all brainstem structures (including medulla) was only found when shooting with P3. Among all airline pressures tested, only P3 caused laceration of the midbrain and pons. Neither hemorrhage nor laceration was observed for brainstem structures in heads shot with the non-penetrating method (Table 3).

Table 3. Hemorrhage and laceration observed in the brainstem structures during *post mortem* examination according to method of stunning and airline pressure.

Brainstem structure	Hemorrhage – [Laceration]			
	P1 (%) n=10	P2 (%) n=10	P3 (%) n=12	NP (%) n=10
Midbrain	1 (10) – [0]	1 (10) – [0]	5 (41.7) – [4 (33.3)]	0 – [0]
Pons	0 – [0]	1 (10) – [0]	4 (33.3) – [1 (8.3)]	0 – [0]
Medulla	0 – [0]	0 – [0]	3 (25) – [0]	0 – [0]

Penetrating method: P1=160 *psi*; P2=175 *psi*; P3=190 *psi*

Non-penetrating method: NP=220 *psi*

Hemorrhage recognized when at least one single blood clot was observed

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first published study to evaluate brain damage of cattle stunned with pneumatically powered non- and penetrating captive bolt guns operating with different levels of airline pressures.

The study found that bolt penetration depth, damage to the brainstem structures and hemorrhage in ventricles and over the entire cerebral hemispheres, was greatest for heads shot with the penetrating gun at 190 *psi*. Work by Oliveira, Gregory, Dalla Costa, Gibson & Paranhos da Costa (2017), reported for this same gun model at 190 *psi*, that it had significantly higher performance indices (such as higher bolt velocity, kinetic energy and energy density) compared to when operating with 160 and 175 *psi*. This explains the extensive damage with 190 *psi* compared to lower pressures, since there is more energy transfer from the moving bolt to the cranium and, consequently, to the deeper structures in the brain. Additionally, heads shot with 160 and 175 *psi* only presented laceration of the frontal and parietal lobes, and it was restricted to the cortical region.

During this study, radiography was used in order to better understand the effects of the levels of airline pressures on bolt penetration depth and to support the previous findings. Accordingly, Figure 2 shows that heads shot with 160 *psi* had the shallowest penetration (Figure 2a), followed by head shot with 175 *psi* (Figure 2b). On the other hand, the bolt penetration depth of heads shot with 190 *psi* were notably greater (Figure 2c and 2d). On these specific cases, the bolt penetration angle was rostral rather than caudal, which is not desired when trying to cause direct damage to the brainstem.

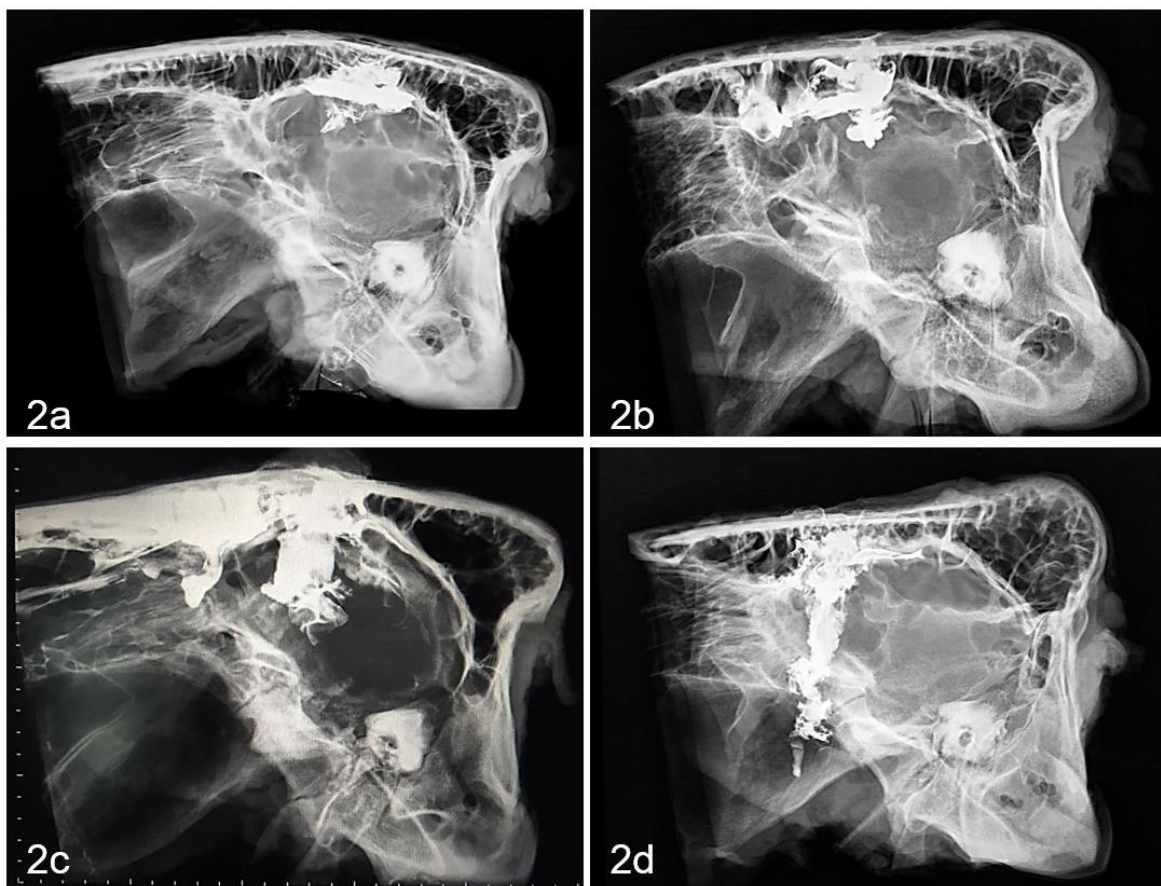


Figure 2. Radiographic images of adult male Nelore cattle shot with pneumatically powered penetrating captive bolt gun with infusion of 5 to 10 ml of barium to produce contrast through the bolt cavity: Cattle shot with PCB gun operating with 160 and 175 *psi* showing a very shallow bolt penetration depth (2a and 2b, respectively). Greater penetration depth caused by PCB operating with 190 *psi* (2c and 2d).

Although the basis of the conscious state is not well understood, it is believed to depend on feedback loops of neural activity between the brainstem reticular activating system and the cerebral cortex (Blumbergs, 1997). In this study, in animals shot with the PCB with 160 and 175 *psi* there was no gross macroscopic damage to the hypothalamus, midbrain, pons and medulla. Accordingly, Gibson et al. (2015) observed that among the alpacas shot with penetrating captive bolt gun that presented signs of incomplete concussion none had any macroscopic damage to the pons and severe damage to the hypothalamus, midbrain and medulla. However, in this study, there was damage to hypothalamus, midbrain, pons and hemorrhage on the medulla (16.7%, 33.3%, 8.3% and 25%, respectively) on heads shot with 190 *psi*. This suggests that penetrating gun operating

with higher airline pressures is more efficient on provoking damage to regions of the brain responsible for maintaining the conscious state.

When shooting at the ideal position for adult Nelore cattle, the approximate angle of bolt penetration needed when trying to reach the brainstem is around 110° - 120° (Oliveira et al., 2017 *personal observations*). Since there was no significant difference in bolt penetration angle between the airline pressures tested for the penetrating method, and the highest airline pressure (190 *psi*) was the only treatment to cause damage to the brainstem, it was concluded that only this airline pressure is effective in producing sufficient macroscopic damage to induce unconsciousness.

Subarachnoid hemorrhage in the occipital lobe was more frequently observed in heads shot with the NPCB. Presumably, the greater acceleration/deceleration forces imparted by a larger diameter bolt caused rotational and shear forces to the head and brain (Ommaya, Goldsmith & Thibault, 2002), producing a wider distribution of blood clots on the opposite side to that which was directly impacted. Moreover, the thinner skin and bone of cattle shot with the NPCB gun makes the cranium less resistant to the effects of the bolt impact, since, as stated by Currey (2003), the thicker the bone the stiffer it will be. Similarly, Finnie (1997) stated that much greater energy is required to penetrate the thicker skull bones of mature bulls.

5. Conclusions

Shooting adult Nelore cattle with a pneumatically powered penetrating captive bolt gun operating with lower airline pressures failed to produce sufficient damage to brainstem structures. Only PCB operating with 190 *psi* produced damage to the hypothalamus and brainstem, which has been previously associated as being important for inducing unconsciousness.

Direct damage to the brainstem requires deeper penetration of the bolt, which was achieved only when shooting with penetrating gun operating with 190 *psi*. Thus, these results could be used as guidelines, demonstrating that lower levels of airline pressures should not be used for stunning and dispatch of adult cattle.

Acknowledgements

The authors would like to thank Everton Adriano Andrade, Carlos Alberto de Oliveira Silva and the researchers from Group ETCO, in special to Karen Camille Rocha Góis for all the help during the period of data collection. Sincere thanks go to CNPq (National Council of Technological and Scientific Development) for granting the scholarships to Steffan Edward Octávio Oliveira and Filipe Antônio Dalla Costa. The authors are grateful to FAPESP for the financial support to bring Dr. Neville George Gregory to Brazil, which participated integrally of this study and to JBS for the manpower and facilities usage. Thank also to Dr. Osmar Antônio Dalla Costa and Arlei Coldebella for assisting the data analysis.

6. References

Blumbergs, P. C. (1997). Pathology. In: Reilly P, Bullock R, editors. Head injury. Pathophysiology and management of severe closed injury. Chapman and Hall Medical, London, p. 39-70.

Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T., Strecker, R. E., & McCarley, R. W. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiological Reviews*, 92, 1087–1187.

Carey, M. E., Sarna, G. S., Farrell, J. B., & Happel, L. T. (1989). Experimental missile wound to the brain. *Journal of Neurosurgery*, 71, 754–764.

Currey, J. D. (2003). How well are bones designed to resist fracture? *Journal of Bone and Mineral Research*, 18, 591-598.

EFSA, European Food Safety Authority. (2013). Scientific Opinion on monitoring procedures at slaughterhouses for bovines. *The EFSA Journal*, 11(12), 1-65.

Finnie, J. W. (1997). Traumatic head injury in ruminant livestock. *Australian Veterinary Journal*, 75, 204-208.

Gibson, T. J., Ridler, A. L., Lamb, C. R., Williams, A., Giles, S., & Gregory, N. G. (2012). Preliminary evaluation of the effectiveness of captive-bolt guns as a killing method without

exsanguination for horned and unhorned sheep. *Animal Welfare*, 21, 35–42.

Gregory, N. G. (1998a). Animal welfare and meat science. Ed Neville G. Gregory; with guest chapter by Temple Grandin. Publ. Oxon, UK; New York, NY, USA: CABI Pub.

Gregory, N. G. (1998b). Stunning and slaughter. In N. G. Gregory (Ed.), *Animal Welfare and Meat Science* (pp. 223–240). Wallingford, UK: CAB Publishing.

Karger, B. (1995). Penetrating gunshots to the head and lack of immediate incapacitation. II. Review of case reports. *International Journal of Legal Medicine*, 108, 117–126.

Laureys, S. (2005b). Science and society: Death, unconsciousness and the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 899–909.

Ommaya, A.K., Goldsmith, W., Thibault, L. (2002). Biomechanics and neuropathology of adult and pediatric head injury. *British Journal of Neurosurgery*, 19, 843–853.

Posner, J. B., Saper, C. B., Schiff, N., & Plum, F. (2008). *Plum and Posner's Diagnosis of Stupor and Coma* (4 ed.). Oxford University Press.

Viel, G., Schroder, A. S., Puschel, K., & Braun, C. (2009). Planned complex suicide by penetrating captive-bolt gunshot and hanging: Case study and review of the literature. *Forensic Science International*, 187, 7–11.

CAPÍTULO 5 - FINAL CONSIDERATIONS

The results found on this study highlights the importance of always choose the higher airline pressure when shooting with pneumatically powered captive bolt guns. On the second chapter, the authors showed that although the manufacturers recommend an operational airline pressure range between 160 – 190 *psi* for the penetrating method, there was a significant difference on the stunning efficiency of adult cattle. Among others reasons, the authors found that it would be due the best performance of the captive bolt guns when shooting with 190 *psi*, since when shooting with this pressure the bolt velocity was significantly higher when compared to the others, reason why cattle showed significant less signals of incomplete concussion.

When comparing the methods penetrating and non-penetrating (third chapter), using the same gun brand (USSS-1 vs. USSS2A, Jarvis®) the authors found that there is a higher risk of a shallow depth of concussion when using the non-penetrating method. It is important to recall that for both methods the airline pressures were set at its maximum, according to the manufacturer recommendations or to the limits of air supply of each abattoir (190 vs. 210-220, PCB and NPCB, respectively). At this phase of the study, the authors found very important and worrying results. Firstly, there was a higher occurrence of two or more shots when using the non-penetrating method. Secondly, many shots were given even after the animals has already collapsed (this may show the lack of confidence on this method by the operator). Finally, the non-penetrating gun showed a worse performance when compared to the values recommended on literature, which may negatively affect the depth of concussion.

The fourth and last chapter of this study focused on trying to understand the reasons behind the methods and airline pressures tested which may have affected the efficiency of stunning by evaluating the consequent brain lesions. As expected, the authors found that shooting with penetrating method set at its higher airline pressure (190 *psi*) caused deeper penetration depth of the captive bolt into the

brain and only this pressure was able to reach the brain stem structures, which are responsible for maintaining the conscious state.

In summary, this study provides very relevant results to the industry and brings to light the question: How far can we really trust on the level of airline pressure showed at the abattoirs as an efficient measure of good functioning of the guns used? In this case, the author strongly suggest that new studies considering the bolt velocity as parameter to be carried out.

In the case that this new studies demonstrates that the level of airline pressure showed at different abattoirs do not represent the real air supply that powers the gun, or if different guns will have different performance with the same airline pressure supply, it could completely change the way that the manufacturers makes its recommendations and how to verify if the guns are working properly or not.

In this scenario, the author recommend that a bolt velocity meter to be used during daily routine of abattoirs. This device could be connected to people responsible for maintenance of the guns and even to the manufacturers (e.g. through wireless system and smartphone app), providing information about its performance and making the improvement of these devices more efficient, ensuring that the guns are working, at least, according to the minimum recommendations. Further improvements on the pneumatically powered captive bolt guns could include an integrated bolt velocity meter, providing real time information about any changes on its performance and avoiding ineffective stunning due malfunctioning.