



Tesi Doctoral

**Atordiment amb nitrogen: efectes sobre el benestar animal i la qualitat del producte final en porcí**

Memòria presentada per  
Pol Llonch i Obiols

Per accedir al grau de Doctor del programa de Producció Animal

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, març de 2012



**ANTONIO VELARDE CALVO**, investigador del Programa de Nutrició i Benestar Animal del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, i **XAVIER MANTECA VILANOVA**, catedràtic del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

certifiquen:

Que la memòria titulada **“Atordiment amb nitrogen: efectes sobre el benestar animal i la qualitat del producte final en porcí”**, presentada per Pol Llonch i Obiols per optar al grau de Doctor en Veterinària, ha estat realitzada sota llur direcció i, considerant-la acabada, autoritzen la seva presentació per tal que sigui jutjada per la comissió corresponent.

I perquè consti als efectes oportuns, signen el present certificat a Bellaterra, el 23 de març de 2012.

Dr. Antonio Velarde Calvo

Dr. Xavier Manteca Vilanova



Aquest projecte ha estat finançat per l'Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España. L'autor d'aquesta memòria ha gaudit d'una Beca de Formació de Personal Investigador de la mateixa institució.



## AGRAÏMENTS

A qui primer he de fer referència és a les persones que tenen la culpa que estigui escrivint aquestes línies. El Xavi i el Velarde o el Velarde i el Xavi. M'heu brindat la valuosa oportunitat d'endinsar-me en el món de la recerca per la qual cosa us estaré sempre agraït. Però molt més que això al vostre costat he après moltíssim (i espero que pugui fer-ho durant molt de temps) de l'esforç, del treball en equip i de la passió per la feina ben feta. Sens dubte, com a directors de tesi, heu format un tàndem en què les vostres grandíssimes capacitats s'han complementat eficaçment.

Vull fer extensiu aquest agraïment inicial a la resta de components del grup de benestar de l'IRTA. Al Toni Dalmau, qui en molts moments ha estat el meu director de tesi *De facto*. Segurament ningú s'ha empassat tantes correccions i dubtes existencials com tu, ajudant-me sempre allà on calgués. M'acompanyarà sempre aquella pregunta que amb vehemència vas adreçar-me en els inicis d'aquest projecte: “Pol en un esmorzar continental, tu qui vols ser el porc o la gallina?” Espero haver estat a l'alçada del porc. Al Pedro per proporcionar-me la calma necessària per a dur a terme tots els experiments d'aquesta tesi, sense tu segurament ja estaria tancat en algun manicomi. Sens dubte has aportat un toc caribeny a aquesta tesi la qual cosa m'ha ajudat a gaudir el dia a dia d'aquest llarg trajecte. A l'Eva que quan al començar em veies navegant sense rumb em vas guiar amb paciència i serenitat. També a l'Emma, la Ceci i a la Mari Carmen, gràcies per tenir sempre tant clar el mètode científic, que a mi a vegades la passió em fa oblidar.

Gràcies a tota la família de la Polivalent per les coques casolanes, pels comentaris en veu alta, per la celebració de Sant Pol valent i pels farts de riure que ens hem fet. Als veterans Núria i Joel (per ordre d'arribada eh) qui tantes preguntes d'estadística i qualitat m'heu aguantat. A la Maria Pérez i la Marta Blanch o als que heu arribat més tard (Albert Brun, Anna Carabús, Saoussan, Dario...), ha estat un plaer.

També vull agrair a tota la gent de l'IRTA i en especial a tots els integrants de la Unitat 41, que tant bé em vareu adoptar quan vaig haver de deixar el meu estimat Sabadell. A la M<sup>a</sup> Àngels per cuidar-me tant i la M<sup>a</sup> José, l'Agustí i l'Albert per ensenyar-me com es treballa amb les botes posades.

Fent un saltet 100 km més al sud, vull agrair als integrants de l'equip d'etologia de la UAB i en especial a la Débo. Hem compartit experiments, congressos, discussions a vegades fins i tot t'he fet enfadar una miqueta, en fi noia deu ser la confiança... També al Pepe, l'home per a tot, gràcies pel teu bon humor i la teva manera d'entendre la ciència. A la Marta, la Vale, la Susana i en Tomàs, heu estat la família adoptiva quan m'escapo a la UAB.

Also I would like to thank to Bert Lambooij and Hans van de Vis as well as their collaborators Vincent Hindle and Henny Reimert for their hospitality during my stay in The Netherlands. With you I could know that fishes are also sentient being who require humane methods to slaughter them.

En el terreny personal vull agrair a tots els amics de Sabadell que heu estat una mostra poblacional, sense saber-ho, que m'ha servit per conèixer l'opinió de la societat sobre l'ús dels animals. També en l'àmbit dels amics, tots els companys de promoció de veterinària us haig d'agrair fer-me tocar de peus a terra tot mostrant-me que els animals, a banda d'éssers sensibles, també són un puntal del sistema agroalimentari.

I finalment, vull agrair especialment tot el suport rebut de la meva família, tant la directa (Llonch i Obiols) com la que m'ha adoptat com un membre més (Torruella i Blasi). Als meus pares el Pete i l'Àngels, tot el què sóc us ho dec a vosaltres. A les nenes, la Georgina i l'Ari i als meus cunyats Enric i Joan. A tots, gràcies per aguantar-me les anades i vingudes, pels sobretauls de diumenge arreglant el món i pel vostre recolzament incondicional que sempre m'heu transmès. I per últim a la persona més important durant aquest trajecte, la Cristina. Gràcies per la teva paciència i suport durant aquests 4 anys. Companya de victòries i derrotes, d'alegries i penes, amb qui un dia vaig decidir compartir la vida amb tu, sens dubte aquesta ha estat la millor decisió que he pres mai.

No voldria acabar sense tenir un record pels 196 porcs que, ells sí, han donat la vida per la ciència, donant tot el què tenien per tal que, algun dia, tots els seus coespecífics puguin gaudir d'un millor benestar fins l'últim moment de la seva vida.

A tots, gràcies.



**“It requires very little knowledge to care passionately about animals. It requires a great deal of understanding to care properly for them.”**

(John WEBSTER, Investigador)

**“Quien a las bestias hace mal es bestia cabal”**

(ANÒNIM, Proverbi castellà)



## RESUM

La inhalació d'elevades concentracions de CO<sub>2</sub> causa aversió en porcs. L'objectiu general d'aquesta tesi va ser determinar el grau d'afectació del benestar animal, mitjançant l'avaluació de l'aversió i del temps necessari en perdre la consciència, i de la qualitat de la canal i de la carn en porcs atordits amb diferents mescles de nitrogen i CO<sub>2</sub>. Es van realitzar 4 experiments amb un total de 206 porcs. Al primer, amb l'objectiu d'avaluar el grau d'aversió, els animals van ser acompanyats dins d'una gàbia i immersos en un pou, durant 4 sessions consecutives. A la primera, el pou contenia aire (control) mentre que les 3 sessions posteriors contenia una mescla diferent de gas (70N30C, 80N20C i 85N15C). Es va avaluar el temps que cada animal tardava en entrar a la gàbia en successives sessions. Durant el descens al pou, es van mesurar els comportaments indicadors d'aversió com els intents de retirada i d'escapada, el gasping, les vocalitzacions i la fase d'excitació muscular. Tenint en compte que el temps per entrar a la gàbia no va variar entre els tres gasos i l'aire, l'exposició a mescles de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> no constitueixen un estímul negatiu que els animals tracten d'evitar. Un 22,2% dels animals van mostrar intents d'escapada durant l'exposició a qualsevol dels gasos davant d'un 7,5% a l'aire. Les vocalitzacions, el gasping i l'excitació muscular va ser presents només quan els animals inhalaven les mescles de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Segons aquests resultats l'exposició a 70N30C, 80N20C i 85N15C és més aversiu que l'exposició a l'aire atmosfèric. A més segons el nombre d'animals que van mostrar gasping, a major concentració de CO<sub>2</sub> major era la sensació d'asfíxia. L'objectiu del segon estudi era validar l'*Index of Consciousness* (IoC) com a indicador de l'activitat cerebral en porcs anestesiats i correlacionar-ho amb la pèrdua de la postura i el reflex corneal com a indicadors de consciència. Els resultats van determinar que la baixada de l'activitat cerebral segons el IoC (als 41 s) i el moment en que es produïa la pèrdua de la postura (als 34 s) estaven relacionats. En el tercer estudi es va mesurar l'activitat cerebral dels porcs durant l'exposició a les mescles (70N30C, 80N20C i 85N15C) i a 90C amb l'objectiu de determinar el moment en perdre la consciència. La disminució de l'activitat cerebral es va produir als 37,6 s (90C), 45,2 s (70N30C), 46,9 s (80N20C) i 43,3 s (85N15C) després del inici de l'exposició, la qual cosa implica que els intents d'escapada, gasping i vocalitzacions van iniciar-se abans. Un cop finalitzada l'exposició, d'acord amb la recuperació d'alguns reflexes del tronc cerebral, la consciència es va recuperar més aviat en els animals atordits amb les mescles de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Aquests resultats no van poder ser confirmats per l'activitat cerebral. L'objectiu del quart experiment va ser avaluar la qualitat de la carn i de la canal atordint amb nitrogen en comparació al 90C i relacionar-ho amb el comportament durant la inhalació. Els animals atordits amb 80N20C i 85N15C tenien un pH45 menor que els animals exposats a 90C, provocat per la major durada de la fase d'excitació muscular. A més, també per aquest efecte, el 25% dels animals exposats a barreges de N<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> presentaven equimosis a la canal, cosa que no es va observar al 90C. En resum, l'ús de barreges de nitrogen i CO<sub>2</sub> (<30%) redueix l'aversió en comparació a un 90% de CO<sub>2</sub>. Tanmateix, l'ús d'aquestes mescles implica la disminució de la velocitat d'inducció i del temps d'inconsciència així com un augment de les carns exsudatives i les equimosis.



## ABSTRACT

Inhalation of high concentrations of CO<sub>2</sub> causes aversion in pigs. The aim of this thesis was to assess animal welfare, by means of the aversion suffered as well as the time to lose consciousness, and the meat and carcass quality in pigs stunned with different CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> mixtures. Four experiments were developed where 206 pigs were used. In the first experiment, with the aim to assess aversion, the animals were lead into a crate and subsequently descended into a pit for four consecutive sessions. In the first session, the pit contained atmospheric air (control) whereas in the three following sessions the pit contained a different gas mixture (70N30C, 80N20C i 85N15C). The time to enter the crate during consecutive sessions was assessed. During descending, several indicators of aversion such retreat and escape attempts, gasping, vocalisations and muscular excitation were assessed. The time to enter the crate did not change during the air and gas treatment sessions so the exposure to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures does not represent a negative stimulus that animals try to avoid in consecutive sessions. A 22.2% of animals showed escape attempts during exposure to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures whereas when they were exposed to atmospheric air only a 7.5% did so. Vocalisations, gasping and muscular excitation were only present when animals were exposed to the gas treatments. According to these results, exposure to 70N30C, 80N20C i 85N15C is more aversive than exposure to atmospheric air. Moreover, regarding the number of animals that performed gasping, a higher CO<sub>2</sub> concentration increased the sense of breathlessness. The aim of the second experiment was to assess the feasibility of the *Index of Consciousness* (IoC) as an indicator of the brain activity in anaesthetised pigs and its relation with the loss of balance and the corneal reflex used as indicators of consciousness. According to the IoC, the decrease of the brain activity (41 s) and the time to lose posture (34 s) were related. In the third experiment, brain activity was assessed in pigs during the exposure to 70N30C, 80N20C i 85N15C as well as 90C with the aim to assess the time to lose consciousness. The significant decrease of the brain activity occurred at 37.6 s (90C), 45.2 s (70N30C), 46.9 s (80N20C) and 43.3 s (85N15C) after the beginning of exposure which implies that escape attempts, gasping and vocalisations started before that time. Once the exposure was finished, and according to the time to recover different brain stem reflexes, consciousness was recovered before in animals exposed to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures than in animals exposed to 90C. These results could not be confirmed by brain activity assessment. The aim of the fourth experiment was to assess meat and carcass quality of the animals stunned with the N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixtures compared to those stunned with 90C and to relate meat and carcass quality with the behaviour of the animals during gas exposure. The animals stunned with 80N20C and 85N15C had a lower pH<sub>45</sub> than those exposed to 90C, due to a longer duration of the muscular excitation during gas exposure. Also due to this effect, a 25% of the animals exposed to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixtures presented carcasses with ecchymosis, which were not seen in 90C stunning. In summary, the use of the nitrogen and CO<sub>2</sub> (<30%) gas mixtures reduces aversion compared to 90C. However, the use of these gas mixtures implies a slower induction to unconsciousness, a reduction of the unconsciousness duration after exposure, and a rise of the exudative meat and ecchymosis in the carcass.



## ÍNDICE GENERAL

---





## ÍNDIX

CAPÍTOL 1 / CHAPTER 1 Revisió Bibliogràfica.....	1
1 EL CONCEPTE DE BENESTAR ANIMAL.....	1
1.1 L'ètica com a fonament del benestar animal.....	2
1.2 Conceptes ètics del benestar animal.....	3
1.2.1 La visió dualista.....	3
1.2.2 La visió monista.....	5
1.2.3 La teoria dels nivells continus.....	6
1.2.4 L'època contemporània.....	7
1.2.5 Ètica aplicada al sacrifici d'animals.....	8
2 BENESTAR ANIMAL DURANT EL SACRIFICI.....	9
2.1 Sistemes d'atordiment en porcs.....	10
2.1.1 Atordiment mecànic.....	11
2.1.2 Atordiment elèctric.....	11
2.1.3 Atordiment per exposició a altes concentracions de CO <sub>2</sub> .....	13
3 GASOS ALTERNATIUS AL CO <sub>2</sub> .....	18
3.1 Gasos inerts.....	19
3.1.1 L'argó.....	21
3.1.2 El nitrogen.....	22
4 AVALUACIÓ DEL BENESTAR ANIMAL DURANT EL SACRIFICI.....	24
4.1 Mesura de l'aversion.....	25
4.2 Mesura de la inconsciència.....	26
4.2.1 Mètodes basats en l'EEG.....	27
4.2.2 Mètodes basats en el comportament i els reflexos fisiològics.....	29
4.3 Mesura de la qualitat de la carn.....	31
5 BIBLIOGRAFIA.....	35

CAPÍTOL 2 / CHAPTER 2 Objectius.....	49
CAPÍTOL 3 / CHAPTER 3 Aversion to nitrogen and carbon dioxide mixtures for stunning pigs .....	55
ABSTRACT.....	57
1 INTRODUCTION.....	59
2 MATERIAL AND METHODS.....	61
2.1 Animals.....	61
2.2 Facilities .....	61
2.3 Experimental procedure.....	62
2.4 Measurements .....	63
2.5 Statistical Analysis .....	64
3 RESULTS.....	64
3.1 Control session .....	64
3.2 Treatment sessions.....	65
4 DISCUSSION.....	67
5 CONCLUSIONS .....	70
6 ACKNOWLEDGMENTS .....	70
7 REFERENCES .....	70
CAPÍTOL 4 / CHAPTER 4 Assessment of consciousness during Propofol anaesthesia in pigs .....	73
1 INTRODUCTION.....	75
2 MATERIAL AND METHODS.....	75
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	76
4 CONCLUSIONS .....	77
5 ACKNOWLEDGEMENTS .....	78
6 REFERENCES .....	78

---

CAPÍTOL 5 / CHAPTER 5 Assessment of unconsciousness in pigs during exposure to nitrogen and carbon dioxide mixtures.....	81
ABSTRACT.....	83
1 INTRODUCTION.....	85
2 MATERIAL AND METHODS.....	87
2.1 Animals.....	87
2.2 Facilities .....	87
2.3 Stunning and recording procedures .....	87
2.4 Measurements .....	88
2.5 Statistical Analysis .....	90
3 RESULTS.....	90
3.1 Brain activity .....	90
3.2 Behaviour .....	91
3.3 Physiological reflexes.....	93
4 DISCUSSION.....	94
5 CONCLUSIONS .....	98
6 ACKNOWLEDGEMENTS .....	99
7 REFERENCES .....	99
CAPÍTOL 6 / CHAPTER 6 Stunning pigs with nitrogen and carbon dioxide mixtures: effects on animal welfare and meat quality.....	103
ABSTRACT.....	105
1 INTRODUCTION.....	107
2 MATERIALS AND METHODS .....	108
2.1 Animals.....	108
2.2 Facilities .....	108
2.3 Slaughter procedure .....	109
2.4 Behaviour measurements.....	109

2.5	Carcass and meat quality measurements .....	110
2.6	Statistical analysis .....	111
3	RESULTS .....	112
3.1	Aversion .....	112
3.2	Loss of sensibility .....	113
3.3	Carcass and meat quality .....	115
4	DISCUSSION.....	118
4.1	Animal welfare .....	118
4.2	Carcass and meat quality .....	120
5	CONCLUSIONS .....	122
6	ACKNOWLEDGMENTS .....	122
7	REFERENCES .....	122
CAPÍTOL 7 / CHAPTER 7 Discussió General.....		127
DISCUSSIÓ GENERAL .....		129
1	AVERSIÓ A LES BARREGES DE GASOS .....	130
1.1	Aversió per aprenentatge .....	131
1.2	Conductes indicadores d'aversió .....	132
1.2.1	Intents de retirada i d'escapada.....	132
1.2.2	Fase d'excitació muscular.....	133
1.2.3	Vocalitzacions.....	134
1.2.4	Gasping (exhalació) .....	136
2	INDUCCIÓ A LA INCONSCIÈNCIA .....	137
2.1	Validació de l'IoC com a mesura de l'activitat cerebral en porcs.....	137
2.2	Avaluació de l'activitat cerebral en porcs durant la inhalació de 70N30C, 80N20C, 85N15C i 90C mitjançant el IoC. ....	138
2.3	Avaluació de la recuperació de la consciència .....	140

3	QUALITAT DE LA CARN I DE LA CANAL .....	142
3.1	Qualitat de la carn.....	142
3.2	Qualitat de la canal .....	143
4	BIBLIOGRAFIA.....	144
	CONCLUSIONS .....	149



## ÍNDIX TAULES

## CAPÍTOL 1/CHAPTER 1

Taula 1. Temps (s) de pèrdua de la consciència determinat per diferents mètodes després de l'exposició a diferents concentracions de CO<sub>2</sub> .....16

Taula 2. Criteris de definició de les característiques de carn PSE segons paràmetres tecnològics (pH, conductivitat elèctrica, pèrdues per degoteig i color).....33

CAPÍTOL 3 / CHAPTER 3 Aversion to nitrogen and carbon dioxide mixtures for stunning pigs

Table 1. Percentages (%) of animals showing retreat attempts, escape attempts, vocalizations, muscular excitation and gasping by treatments 70N30C, 80N20C and 85N15C.....66

CAPÍTOL 5 / CHAPTER 5 Assessment of unconsciousness in pigs during exposure to nitrogen and carbon dioxide mixtures

Table 1. Percentage of pigs performing gasping and vocalisations during the exposure to 70N30C, 80N20C, 85N15C and 90C gas mixtures. ....92

Table 2. Mean and standard error of the time (s) of duration of the muscular excitation during the exposure and time (s) to perform corneal reflex and response to pain after exposure to 90C, 70N30C, 80N20C and 85N15C. ....93

CAPÍTOL 6 / CHAPTER 6 Stunning pigs with nitrogen and carbon dioxide mixtures: effects on animal welfare and meat quality

Table 1. Mean and standard error of the time (s) to perform gasping, duration of the muscular excitation during the exposure to 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C). ....113

Table 2. Mean and standard error of the time (s) to perform corneal reflex and rhythmic after exposure to 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).....115

Table 3. Mean and standard error of the meat quality measurements in *Semimembranosus* (SM) and *Longissimus thoracis* (LT) in pigs stunned with

## Índex

---

90% CO <sub>2</sub> (90C), 70% N <sub>2</sub> and 30% CO <sub>2</sub> (70N30C), 80% N <sub>2</sub> and 20% CO <sub>2</sub> (80N20C) and 85% N <sub>2</sub> and 15% CO <sub>2</sub> (85N15C). .....	116
--	-----



## ÍNDEX FIGURES

## CAPÍTOL 1 / CHAPTER 1

Figura 1. Gravats on consta l'atordiment dels animals previ al sacrifici. (a) Capitell del claustre de Santa Maria de l'Estany (L'estany, Bages, Catalunya) (b) Den medeltida kokboken, Llibre de cuina medieval, Maggie Black, 1993 .....8

Figura 2. Esquema dels intervals a respectar per dur a terme un sacrifici humanitari.....10

Figura 3. Temps que van tardar els animals a retirar-se de la zona d'alimentació quan aquesta contenia una atmosfera d'aire, una atmosfera que provocava anòxia mitjançant gasos inerts, una atmosfera que provocava hipercàpnia (90 % CO<sub>2</sub>) i una atmosfera que provocava hipercàpnia havent estat dejunats 12 hores abans .....20

Figura 4. Arbre de decisió dels aspectes que afecten l'elecció d'una barreja de gasos per a l'atordiment.....24

Figura 5. Del registre de l'EEG s'extreuen tres paràmetres, la proporció de beta, la dinàmica de símbols i la taxa de supressió. El mètode que s'utilitza per calcular l'IoC es basa en la integració dels tres paràmetres. Adaptat de Revuelta *et al.* (2008) .....29

Figura 6. Diagrama que representa les relacions entre la reactivitat a l'estrès, les condicions de sacrifici i qualitat de la carn. (1) Els nivells d'estrès depenen de: (a) característiques de la situació anterior al sacrifici, (b) els antecedents genètics, (c) l'experiència prèvia. (2) L'estrès percebut provoca respostes de comportament i fisiològiques. L'efecte d'aquestes respostes en el metabolisme del múscul depèn de: (a) l'experiència prèvia de l'animal i (b) els antecedents genètics de l'animal.....32

CAPÍTOL 3 / CHAPTER 3 Aversion to nitrogen and carbon dioxide mixtures for stunning pigs

Figure 1. Average time to perform retreat and escape attempts, gasping, loss of balance muscular excitation and vocalisations during gas exposure.....65

CAPÍTOL 4 / CHAPTER 4 Assessment of consciousness during Propofol anaesthesia in pigs

Figure 1. Mean values of IoC and BS% during anaesthesia. The time to loss balance is shown with a bar.....77

CAPÍTOL 5/CHAPTER 5 Assessment of unconsciousness in pigs during exposure to nitrogen and carbon dioxide mixtures

Figure 1. Example of a raw EEG and the IoC and ESR graphs during the recovery and exposure in pigs exposed to 80N20C. Onset of gasping, vocalisations and loss of balance marked with a red, green and blue bar respectively. The exposure time corresponds to the interval between the spotted bars. ....91

CAPÍTOL 6/CHAPTER 6 Stunning pigs with nitrogen and carbon dioxide mixtures: effects on animal welfare and meat quality

Figure 1. Percentage (%) of pigs that showed escape attempts, gasping and vocalisations during the exposure to 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).....112

Figure 2. Cumulative percentage (%) of pigs that performed corneal reflex after the end of exposure to 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).....114

Figure 3. Cumulative percentage (%) of pigs that performed rhythmic breathing after the end of exposure to 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C). ....114

Figure 4. Percentage (%) of carcasses with RSE meat in pigs stunned with 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).....117

**CAPÍTOL 1 / CHAPTER 1**  
**Revisió Bibliogràfica**

---







## 1 EL CONCEPTE DE BENESTAR ANIMAL

La definició de benestar animal pot variar en funció dels criteris que es tinguin en compte a l'hora d'avaluar-lo. En funció del criteri que s'utilitzi, existeixen tres definicions generals de benestar.

Una primera definició estableix que el benestar d'un animal és bo quan experimenta emocions positives o com a mínim no n'experimenta de negatives. Diferents estudis han demostrat que els animals són éssers sensibles capaços de sentir tant emocions negatives (dolor, patiment o angoixa) com positives (plaer) (Dawkins, 2000; Mendl i Paul, 2004; Boissy *et al.*, 2007). Per aconseguir mesurar aquestes emocions s'han utilitzat les respostes de comportament (Mendl *et al.*, 2009 revisió). Aquest sistema d'avaluació de les emocions aporta una elevada quantitat d'informació. Tanmateix, aquesta avaluació pot comportar problemes d'interpretació (Rushen, 2003; Paul *et al.*, 2005).

Un segon enfocament del benestar animal es basa en el correcte funcionament biològic de l'organisme (Fraser, 1990) segons el qual, el benestar d'un individu és l'estat en el qual es troba aquest individu en relació amb els intents per adaptar-se al medi que l'envolta (Broom, 1986). Per fer front a una amenaça, l'organisme activa els sistemes de reparació del cos, les defenses immunològiques, les respostes d'estrès fisiològic i diverses respostes comportamentals. El cost biològic d'aquestes respostes pot afectar el creixement, la salut i la reproducció dels animals (Barnett *et al.*, 2001). Així doncs, per tal de donar una avaluació més precisa del benestar, els indicadors de salut s'han de combinar amb mesures que quantifiquen l'esforç per fer front a una amenaça (Broom i Johnson, 1993). Per exemple, indicadors com la taxa de mortalitat i la incidència de les malalties s'han de combinar amb el comportament (estereotípies, conductes redirigides...) i indicadors fisiològics (per exemple, els nivells de cortisol, la resposta immune). No obstant això, cal destacar que, com en el cas de l'avaluació dels estats emocionals, la relació entre l'estat de benestar animal i els indicadors de funcionament biològic no sempre és senzilla (Rushen, 1991).

Segons la tercera definició de benestar animal, aquest depèn de la mesura en què el comportament que mostra l'animal s'assembla a la conducta "natural" de la seva espècie (Hughes i Duncan, 1988). El patró de comportament normal s'associa

generalment amb el comportament mostrat per la majoria dels membres d'una espècie en condicions naturals. Aquest comportament es pot comparar amb el dels animals de la mateixa espècie en estabulació. De manera general, el benestar es veurà afectat quan la incapacitat per mostrar un determinat comportament provoqui frustració o patiment. No obstant això, resulta difícil determinar el comportament que es pot considerar normal o no, o fins i tot el que és perjudicial, especialment quan es tracta d'animals que viuen en diferents condicions d'allotjament. Ara bé, tal com apuntava Price (1984), les espècies domèstiques han anat ajustant el seu codi genètic per adaptar-se a les condicions de vida en captivitat i, per tant, el seu patró de comportament ha canviat. D'aquesta manera, el fet que els animals en captivitat no mostrin el mateix patró de comportament que els individus silvestres de la mateixa espècie no implica necessàriament que el benestar animal estigui compromès (Veasey *et al.*, 1996).

Per integrar aquests tres conceptes de benestar animal i partint dels postulats del Farm Animal Welfare Council del Regne Unit dels anys setanta, l'Organització Mundial de Epizooties (OIE, 2009) ofereix una visió més concreta, alhora que global, d'aquesta definició. Segons aquesta, un animal està en bon estat de salut si es troba sa, confortable, ben alimentat, capaç d'expressar el seu comportament natural i no pateix cap situació desagradable com dolor, por o estrès. A més, un correcte benestar animal requereix estratègies de prevenció i tractament veterinari així com una nutrició i un maneig apropiat i un sacrifici humanitari. En resum, el benestar animal fa referència a com se senten els animals, però també a com els animals fan front a les condicions ambientals d'on habiten.

### **1.1 L'ètica com a fonament del benestar animal**

Si bé és veritat que una millora del benestar animal pot aportar millores en la productivitat o bé en l'acceptabilitat d'un producte, la preocupació pel benestar animal té el seu origen en una qüestió ètica. Aquesta és el resultat de dos elements: per una banda, el reconeixement del fet que els animals poden experimentar dolor i altres formes de patiment (Bateson, 1991) i, per l'altra, la convicció que causar patiment a un animal no és moralment acceptable, com a mínim si no existeix una raó que ho justifiqui (Manteca i Gasa, 2008).

Segons l'Eurobaròmetre publicat el 2009, la preocupació de la societat en països occidentals per la manera com els animals són tractats ha crescut de manera important



els darrers anys. Aquesta preocupació es basa sobretot en un principi ètic. Aplicat als animals, un tracte ètic és no provocar patiment físic o emocional innecessari.

L'empatia que sentim cap a qualsevol individu afecta la percepció que tenim del seu dolor i com més gran és el grau de semblança entre l'espècie humana i l'individu més gran és la sensibilitat pel seu patiment (Bateson, 1991) i, per tant, més preocupa el tracte que rep. Segons Broom (2003; 2006) el tracte ètic està dirigit més a aquells que identifiquem com a “nosaltres” que cap a aquells que considerem “els altres”. L'acostament als animals i la convivència amb animals ha comportat una identificació d'aquests cada cop més propera amb “nosaltres”, fet que ha provocat el creixement d'un sentiment d'empatia. De fet, segons Serpell i Paul (1994), molts propietaris de mascotes afirmen que veuen les seves mascotes com a part de la seva família. Tot i que segueix existint un tracte moral diferenciat entre animals de companyia i de producció, el cert és que l'empatia envers els animals en general ha augmentat gràcies a la relació que s'estableix entre les persones i els animals de companyia.

En síntesi, el benestar animal com a ciència se sustenta en el tracte ètic dels animals. Tanmateix, no existeix un corrent de pensament unitari en aquest sentit i, des de l'edat antiga fins a la postcontemporània, hi ha hagut algunes etapes en què les obligacions morals envers els animals ha estat fervorosament debatudes.

## **1.2 Conceptes ètics del benestar animal**

La primera època en què es va qüestionar el tracte dels animals fou durant l'antiguitat. Es troben nombroses referències de la relació home-animal en la filosofia grega (Sorabiji, 1993; Münch, 1998). Al llarg del temps han existit bàsicament dues posicions enfrontades. D'una banda, la dualista, la qual afirma que els animals són diferents de les persones i que, per tant, no és necessari que siguin tractats com a tals. D'altra banda, la visió monista declara que les diferències que separen l'home de la resta d'espècies del regne animal no són prou importants i que, per tant, hem de gaudir dels mateixos drets.

### **1.2.1 La visió dualista**

El primer pensador que intervé en el debat sobre el tracte que han de rebre els animals defensant la posició dualista és Aristòtil (segle IV aC). Aquest sosté que és la capacitat per raonar la que diferencia l'home de qualsevol altre ésser viu. Per tant, no es pot tractar de manera justa o injusta un animal o una planta de la mateixa manera que no es

pot tractar de manera justa o injusta una pedra (*Ètica per a Nicòmac*, p. 42, citat a Taubald, 2005). També els estoics, els quals basen la seva filosofia en la raó, neguen que els animals tinguin aquesta capacitat, per la qual cosa s'exclouen de la comunitat moral i consideren que l'home pot fer-ne un ús arbitrari.

Al llarg de l'edat mitjana el discurs ètic al voltant del tracte dels animals queda eclipsat pels valors de la religió cristiana. S'estableix un dualisme entre l'home i la natura al·legant que és la voluntat de Déu que l'home exploti la natura a fi de cobrir les seves necessitats. Com a exemple, es podria destacar la referència que fa la Bíblia, concretament a l'Antic Testament, de la relació entre l'home i la natura: “I déu els beneí [Adam i Eva] i els digué: sigueu fecunds i multipliqueu-vos, colonitzeu la terra i subjugueu-la, domineu cada peix del mar, cada ocell de l'aire i cada ésser viu que es mogui sobre la terra” (Gènesi, 1, 26-28; citat a Taubald, 2005). Aquest pensament servirà de base per a moltes argumentacions que farà el cristianisme en segles posteriors mitjançant pensadors com Gregori de Niça (segle IV) o Sant Agustí (segle V). Aquest darrer, amb una profunda influència aristotèlica, a la seva obra *De civitate Dei* (I,20) (citat a Taubald 2005), exposa “[...] ja que no disposen [els animals] de raó com disposem nosaltres, llavors és un just manament de Déu que la seva vida i mort estigui subordinada a les nostres necessitats”. Sant Tomàs (segle XIII) defensa l'ús dels animals per part dels homes, sobretot com a font d'aliment, de la mateixa manera que els animals fan ús de les plantes: “no importa com l'home tracta els animals, perquè Déu va sotmetre totes les coses al poder de l'home” (*Suma teològica*, I-II 102, 6 ad8; citat a Taubald 2005).

Al segle XVII, Descartes, en un context d'emancipació social, traça una nova aproximació radicalment dualista al llibre *Discours de la méthode* (1637) (citat a Taubald, 2005) i introdueix el concepte que ell anomena *l'animal autòmat*, en què l'home és en essència diferent dels animals. Mentre que l'home posseeix la capacitat de raonar, els animals, que n'estan faltats, són simplement matèria. De fet, Descartes, comparava els animals amb màquines, mancades de consciència i sentiments.

Emmanuel Kant, tot i que té un discurs de base dualista, és el primer autor que defensa que existeixen certes obligacions morals envers els animals. Segons Kant, tot i que l'home, com a ésser superior i racional, pot disposar dels animals a conveniència, és un deure moral tractar els animals de manera compassiva.

Des d'una perspectiva molt diferent però seguint el discurs compassiu de Kant, el premi Nobel de la Pau (1952) Albert Schweitzer declara que, com que la creació de l'univers és una obra de Déu, hem de mostrar respecte per totes les seves criatures i parts. Cal respectar tots els éssers vius independentment de si es tracta de formigues, flors, porcs o persones (Schweitzer, 1923, seccions 17 i 21; citat a Libell, 2005). En la mateixa línia d'argumentació, el papa Joan Pau II fa una de les primeres referències de l'Església catòlica contemporània als drets dels animals afirmant que, en referència amb el món natural, no som solament membres biològics de la naturalesa sinó que també som subjectes morals i que, per tant, l'hem de tractar amb respecte i no la podem violar sense impunitat (*Sollicitudo rei socialis*, 1987; citat a Taubald, 2005).

### 1.2.2 La visió monista

Filòsofs com Pitàgores, Empèdocles o el mateix Plató pensaven que es podia produir la transmigració de l'esperit entre homes i animals durant la reencarnació i que, per tant, la diferència entre l'home i l'animal no és rellevant. Alguns pensadors van transformar el seu estil de vida d'acord amb aquests plantejaments ètics. Plutarc, defensor de la dieta vegetariana, al·legava que el consum de carn no proporciona un plaer suficient pel qual sigui necessari sacrificar un animal. Porfiri partia de la base que provocar la mort és un procés dolorós i, per tant, si els animals són sensibles al dolor, el seu sacrifici per a l'obtenció de carn no és ètic (Libell, 2005).

A les acaballes del segle XVIII, l'argumentació dualista d'arrel cristiana que s'havia instaurat durant l'edat mitjana es veu desafiada cada cop més i apareixen els primers pensadors que expressen la seva disconformitat de la manera com es tracten els animals. Els britànics David Hume i John Locke (segle XVII) contradiuen Descartes afirmant que tot i que l'home és molt superior, els animals també posseeixen sentits i, per tant, de certa capacitat per raonar. Al mateix segle apareix Jeremy Bentham (1789), el qual es considera el pare de l'utilitarisme. Estableix que és la capacitat de patir, més que de raonar, la que atorga drets morals als animals.

Paral·lelament, Voltaire (1764) (citat a Libell, 2005) mostrava la seva indignació sobre la manera com s'utilitzaven els animals en experiments científics i demostracions acadèmiques. Va ser precisament durant els exàmens anatòmics d'animals domèstics, durant experiments i demostracions científiques, que va aparèixer el principi d'analogia. Aquest es basa en el concepte que, si els animals tenen els mateixos òrgans que les

persones i mostren les mateixes estructures anatòmiques, és raonable pensar que poden compartir els mateixos trets que nosaltres així com les capacitats sensibles. Era el primer moment en què es pensava que els animals poden patir com ho fan les persones. Ja en el segle XIX Eicholtz (1805, p.12) (citada a Libell, 2005) suggeria que si els animals tenen els mateixos cinc sentits que nosaltres i, per tant, senten el dolor com el sentim nosaltres, llavors els devem unes obligacions morals. Aquesta visió monista es va veure afavorida per l'arribada de les tesis de Darwin a mitjan segle XIX (1859) que afirmava que l'home i els animals comparteixen un passat evolutiu i que pertanyen al mateix regne.

Durant el segle XIX apareixen nous corrents que censuren la perspectiva dualista, amb pensadors com Arthur Schopenhauer. Al seu llibre *L'ètica de la compassió* rebutjava qualsevol forma de crueltat (Schopenhauer, 1837; Schopenhauer, 1851; citada a Libell, 2005). Segons el filòsof, el significat ètic no rau en la capacitat de raonar sinó en la unitat fisiològica i filosòfica. Mentre vegem els altres com a éssers diferents, en el que ell anomena la il·lusió dualista, hi haurà espai per al tracte cruel entre individus. De fet s'atribueix a Schopenhauer el terme *patocentrisme* que defensa que tots els éssers vius, entenent aquests com a qualsevol organisme viu amb capacitat de sentir o patir, posseeixen un estatus moral. Per tant, la comunitat moral està formada no sols per *agents morals* amb deures i responsabilitats mútues sinó també de *pacients morals*, subjectes amb drets que inclouen també determinades categories d'éssers humans i animals.

### 1.2.3 La teoria dels nivells continus

A llarg del segle XX apareixen alguns autors que critiquen el dualisme ontològic fora de la visió monista (Ferrater-Mora, 1981; Migdley, 1993; Riechmann, 1995) i ho fan entenent que els éssers vius estan en un continu de nivells en la dimensió física, biològica, social i cultural. Aquesta teoria permet tenir en compte els coneixements de què es disposa referents a l'evolució de les espècies desenvolupats per Darwin (1859). Des d'una perspectiva evolutiva, segons la qual unes espècies van donant lloc a altres mitjançant canvis continus i acumulatius, l'abisme ontològic entre humans i els seus ancestres o la resta d'animals deixa de tenir sentit. És evident que existeixen diferències entre una persona i un peix, per exemple, hi ha límits que separen unes espècies de les altres. Ara bé, es tracta de límits dins d'un continu, en què cada nivell ontogènic o

antropològic té unes característiques biològiques diferents que determinen les obligacions morals sobre cada un. Riechmann (1995) posa com a exemple la relació entre el ximpanzé (el nostre parent evolutiu més proper) i els humans. Resulta difícil deixar de banda qualsevol obligació moral sobre animals com el ximpanzé (com es fa amb altres espècies animals molt més llunyans ontogènicament com els crustacis o els mol·luscs) atès que és un animal amb el qual compartim aproximadament el 99 % del codi genètic i amb el qual fins i tot es podrien fer intercanvis d'òrgans entre les dues espècies per a transplantaments.

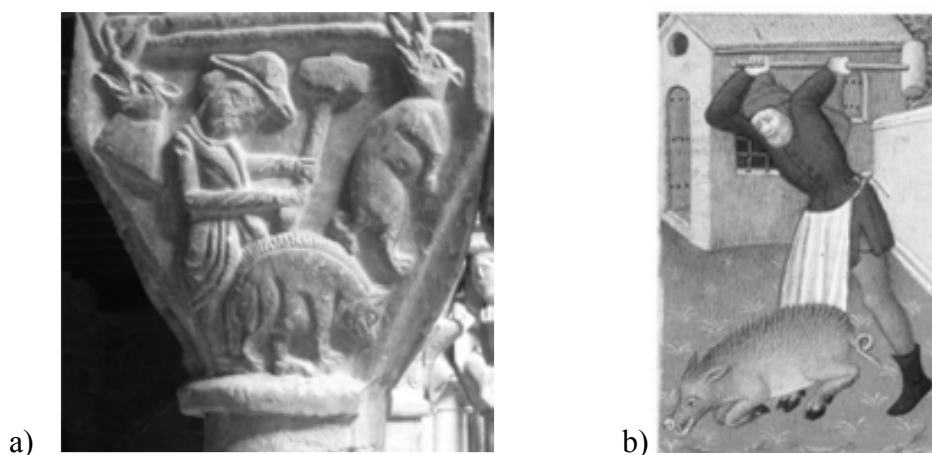
#### 1.2.4 L'època contemporània

Al llarg de l'últim quart de segle (segle XX) la preocupació per la manera com es tracten els animals ha crescut per la influència de diferents pensadors de forta tendència monista. La irrupció del llibre *Animal machines: the new factory farming industry*, de Ruth Harrison (1964), va posar sobre la taula del debat social el benestar d'aquells animals utilitzats per satisfer les necessitats humanes. A partir dels anys setanta, autors com Peter Singer o Tom Regan van liderar un corrent ideològic en el qual es posava els animals en el mateix estatus moral que les persones i conseqüentment es defensava un tracte no diferenciat. La publicació del llibre *Animal liberation* (Singer, 1975) aporta raonaments substancials en favor dels drets dels animals. Seguint l'argumentació que havia iniciat Jeremy Bentham al segle XVII i Schopenhauer al XVIII, Singer proposa que la capacitat de sentir dolor o patir és al centre del que és ètic o no. Tanmateix, no tot el dolor constitueix un mal moral. Tal com afirma Mosterin (1995), el dolor moralment reprovable és aquell que ha estat positivament provocat, és a dir, el que està causat per la interferència humana i que sense aquesta interferència no s'hauria produït. Precisament, apunta Singer, és aquesta capacitat compartida per humans i animals la que fa que tots haguem de ser tractats de la mateixa manera.

A finals del segle XX, aquesta creixent preocupació pel benestar animal es trasllada als òrgans de govern dels països occidentals. El 1966 es creava la comissió Brambell al Regne Unit, la qual va esdevenir la primera iniciativa d'un estat per vetllar pel benestar dels animals. A la Unió Europea, mitjançant el Tractat d'Amsterdam (1999), els estats membres acorden que els animals, com a éssers sensibles, mereixen un tracte humanitari i estableix que el benestar animal sigui prioritari en la normativa que aparegui en relació amb la cria d'animals en benefici de les persones.

### 1.2.5 Ètica aplicada al sacrifici d'animals

El moment previ al sacrifici és un dels més crítics al llarg de la vida de l'animal en què el seu benestar pot quedar més afectat. És per això que un dels principals punts de preocupació social envers el benestar animal és el tracte que reben els animals als escorxadors i especialment que el sacrifici es dugui a terme de manera humanitària (Blackmore i Delany, 1988). Consisteix en la inducció de la mort sense causar ansietat, por, dolor o qualsevol altre tipus de patiment de manera innecessària (Raj, 2008). Deixant de banda la controvèrsia sobre la moralitat de sacrificar animals per al consum humà, el debat ètic que apareix seguidament és si s'ha d'evitar el patiment durant el sacrifici. Epicur, al segle IV aC, suggeria que la mort no és transcendent, però sí que ho són les sensacions que s'experimenten abans d'arribar-hi (David Suits, 2001: "Why death is not bad for the one who died"). A partir del segle XVIII, en un context en què el patocentrisme es començava a expandir a Europa, filòsofs com Jeremy Bentham (*Introducció als principis de la moral i la legislació*, 17, IV, 1789) o Immanuel Kant (*Die metaphysik der sitten*, II, 1, 17; 1797) postulaven que en cas que es causi la mort de qualsevol ésser viu, aquesta ha de ser de la manera més ràpida i menys dolorosa possible. Fins i tot Schopenhauer, el 1840 (*Über die grundlage der moral*), parlava de la obligació no sols de fer-ho d'una manera ràpida i efectiva sinó també indolora, de manera que introduïa el concepte de l'atordiment previ al sacrifici. A l'edat mitjana, aquest debat ètic va traspasar les fronteres de la filosofia i va influenciar la manera com se sacrificaven els animals. Un exemple d'això són els gravats d'aquesta època on es representa l'atordiment previ al sacrifici (figura 1).



**Figura 1. Gravats on consta l'atordiment dels animals previ al sacrifici. (a) Capitell del claustre de Santa Maria de l'Estany (L'estany, Bages, Catalunya) (b) Den medeltida kokboken, Llibre de cuina medieval, Maggie Black, 1993**

No és per atzar, doncs, que la primera legislació de la Comunitat Europea que es va adoptar en matèria de benestar animal fos relativa al procediment de sacrifici per garantir que sigui humanitari (Directiva 74/577/CEE). Aquesta directiva fou el primer marc legal en què es classificaven els animals com a éssers sensibles i en què s'establia l'obligatorietat d'atordir els mamífers i les aus abans del sacrifici. Les normatives comunitàries que van substituir la primera Directiva (la Directiva 119/83/CE primerament i el Reglament (CE) 1099/2009 després) van anar introduint els canvis suggerits per la comunitat científica que havien de millorar el benestar animal durant el sacrifici dels animals de producció. La ciència, doncs, es troba davant l'imperatiu moral de cercar noves pràctiques que permetin dur a terme el sacrifici d'animals lliure de dolor, angoixa o qualsevol tipus de patiment.

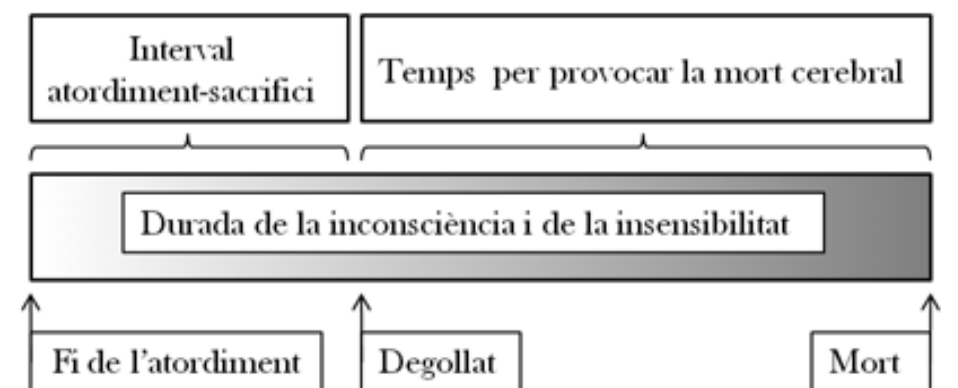
## **2 BENESTAR ANIMAL DURANT EL SACRIFICI**

El sacrifici del porcí es duu a terme procurant un dessagnament ràpid mitjançant la incisió al pit i la secció completa dels vasos sanguinis principals del tronc braquiocefàlic. D'aquesta manera s'aconsegueix una interrupció de l'abastament d'oxigen al cervell. Això causa un dèficit de nutrients i d'oxigen que provocaran una pèrdua gradual de l'activitat cerebral fins a produir la mort de l'animal. Aquest procés pot tardar, segons diferents autors, entre 14 i 30 segons (Hoenderken, 1978; Wotton i Gregory, 1986). Si la incisió s'efectua correctament, els porcs poden perdre entre el 40 % i el 60 % del volum total de sang i en 30 segons ja pot haver perdut el 70 % del total de sang que es perdrà. Tanmateix, si la incisió no s'efectua correctament aquest interval pot allargar-se més d'un minut.

La pell, els músculs, les articulacions, el periosti, la majoria dels òrgans interns i el voltant dels vasos sanguinis contenen receptors del dolor (nociceptors) (von Holleben *et al.*, 2010). Per tant, en un animal conscient, la incisió en qualsevol zona que contingui aquestes estructures pot causar un període de dolor (Kavaliers, 1989) que finalitzarà quan l'animal perdi la consciència. La durada d'aquest interval, doncs, és molt rellevant ja que un cop s'ha fet, i fins que l'animal no perd la consciència, l'animal pot patir dolor, estrès i ansietat (EFSA, 2004).

En la majoria de societats occidentals la normativa estableix que tots els animals han de ser sacrificats de manera humanitària. Un sacrifici humanitari estableix que l'atordiment ha de provocar una pèrdua instantània de la consciència, i en el cas que no sigui

instantània, aquesta s'ha de produir sense causar ansietat, por, dolor o estrès (Raj, 2008). A més, el període d'inconsciència s'ha d'allargar fins que l'animal mori per mort cerebral.



**Figura 2. Esquema dels intervals a respectar per dur a terme un sacrifici humanitari**

A banda del benestar animal, hi ha altres raons per les quals es duu a terme l'atordiment. Tal com s'ha demostrat en nombrosos estudis, l'estrès agut moments abans del sacrifici altera la qualitat de la carn (Cannon *et al.*, 1996; D'Souza *et al.*, 1999; Terlow, 2005). Així doncs, l'abolició de l'estrès durant el dessagnament, que s'aconsegueix amb l'atordiment, comportarà una millora de la qualitat de la carn (Faucitano, 2010). A banda d'això, l'atordiment provocarà una immobilització de l'animal durant el dessagnat, la qual cosa afavorirà la seguretat del personal que desenvolupa les tasques del sacrifici.

## 2.1 Sistemes d'atordiment en porcs

Qualsevol mètode d'atordiment ha d'interrompre l'activitat normal de les neurones o dels neurotransmissors que regulen els mecanismes cerebrals dels animals amb l'objectiu de mantenir-los insensibles i inconscients (Raj, 2008). En l'atordiment de porcs per a consum humà, els mètodes autoritzats a la Unió Europea són l'atordiment mecànic (perforació), l'electronarcosi (elèctric) i l'exposició a elevades concentracions de gasos compostos per diòxid de carboni (CO<sub>2</sub>) i/o gasos inerts com l'argó o el nitrogen (N<sub>2</sub>) (Reglament —CE— 1099/2009). Tanmateix, els mètodes més utilitzats a la majoria d'escorxadors europeus són l'atordiment mecànic, l'electronarcosi i, cada cop més, l'exposició a elevades concentracions de CO<sub>2</sub>. L'atordiment pot ser reversible o irreversible. En el primer cas, els animals poden recuperar la sensibilitat abans que es produeixi la mort. Per tant, el temps que transcorre entre l'atordiment i el degollament és



un factor determinant per a l'eficàcia de l'atordiment. En el segon cas, l'atordiment causa la mort de l'animal, per la qual cosa el temps transcorregut entre l'atordiment i el dessagnament no afecta el benestar animal.

### 2.1.1 Atordiment mecànic

L'atordiment mecànic provoca una pèrdua de la sensibilitat instantània amb mínims efectes sobre el benestar. La percussió pot dur-se a terme mitjançant l'impacte d'un pern que penetri dins la paret òssia de l'os frontal o bé que hi impacti sense penetrar-hi. Si l'impacte no arriba a ser perforant, es produeix la pèrdua de la consciència de manera temporal (Shaw, 2002) mentre que, quan és perforant, produeix una lesió irreversible del còrtex cerebral que indueix a un estat de coma o la mort (EFSA, 2004). En el porcí tan sols està autoritzat l'atordiment mecànic penetrant. Tot i això, no s'utilitza com a mètode d'elecció en els escorxadors ja que presenta un seguit de limitacions. La zona de projecció del cervell és molt petita i el còrtex cerebral es troba situat a una profunditat del crani que dificulta que es pugui garantir un bon atordiment. A més, en porcs, el cervell es troba envoltat per una zona de sinus que el protegeixen, la qual cosa hi dificulta encara més l'accés (HSA, 1998). Si bé aquest mètode està autoritzat per a porcs d'engreix, el seu ús per a verros i truges està desaconsellat. Els animals adults disposen d'un crani més desenvolupat que impedeix que el pern lesioni el còrtex i provoqui una lesió irreversible (Blackmore *et al.*, 1995). A banda d'això, s'ha demostrat que l'atordiment de pern penetrant provoca una fase intensa de convulsions clòniques (Van der Wal, 1978) que disminueixen la maniobrabilitat de les canals, dificulta el dessagnament i poden afectar la seguretat dels treballadors.

### 2.1.2 Atordiment elèctric

L'atordiment elèctric o electronarcosi es basa en l'aplicació de corrent elèctric entre dos elèctrodes situats a cada costat del cervell que indueix un estat d'epilèpsia caracteritzat per convulsions tonicoclòniques (Hoenderken, 1978; Lambooy, 1981; Anil i Lambooi, 2009a). Aquest estat provoca la pèrdua instantània de la consciència a causa de la despolarització de les neurones del sistema nerviós central (SNC) (EFSA, 2004) abans que qualsevol estímul dolorós associat a l'aplicació de corrent pugui ser detectat i transmès a l'SNC (Wotton, 1996). Per garantir la insensibilitat, els elèctrodes s'han de col·locar de tal manera que es garanteixi un pas de corrent pel cervell d'una intensitat mínima de 1,3 A durant un període mínim d'un segon i amb una freqüència que oscil·li

entre els 50 i els 1500 Hz (Hoenderken, 1978). Aquest mètode pot induir també a la mort de l'animal si s'aplica un tercer elèctrode a la zona de projecció del cor amb la finalitat de provocar una fibril·lació ventricular cardíaca.

No obstant això, l'atordiment per electronarcosi pot presentar alguns problemes de benestar i de qualitat del producte final. Per una banda, l'aplicació dels elèctrodes al cap fa que els animals hagin de ser manipulats i subjectats individualment, la qual cosa augmenta l'estrès anterior al sacrifici. A més, en el cas d'una mala col·locació dels elèctrodes (Wotton i O'Callaghan, 2002) o d'un manteniment deficient de l'equip (EFSA, 2004), la intensitat de corrent que passa pel cervell podria no ser suficient i comprometre l'efectivitat de l'atordiment.

En relació amb la qualitat de la carn, existeixen evidències científiques que indiquen que la immobilització dels animals, necessària per dur a terme l'atordiment elèctric, provoca un estrès fisiològic intens que pot fer augmentar la taxa de glicòlisi anaeròbica al múscul (Troeger i Waltersdorf, 1990, 1991; Velarde *et al.*, 2002) que es veu agreujada per l'anòxia a causa de la falta de reg sanguini després del degollament. A través d'aquesta via es produeix una disminució del pH més ràpida de la carn a causa d'una major activitat de l'enzim adenosinatrifosfatasa (ATPasa) i l'acumulació d'àcid làctic al múscul (Monin, 1988; D'Souza *et al.*, 1999; Terlouw, 2005). Aquesta acidificació comportarà una desnaturalització de les proteïnes i una degradació de les fibres musculars (Warris i Brown, 1987) la qual cosa provocarà una gran pèrdua d'aigua i de pigments i es traduirà en carns pàl·lides, toves i exsudatives (PSE) (Velarde *et al.*, 2000). Aquest augment de carns PSE provoca quantioses pèrdues econòmiques a la indústria càrnia (Gispert *et al.*, 2000).

Paral·lelament, l'augment de la pressió arterial i l'activitat muscular durant la fase d'excitació muscular podria produir equimosis al múscul i petèquies al teixit conjuntiu. A més, l'excessiva contracció dels músculs pot causar fractures dels ossos de les potes davanteres i a la columna vertebral (Lambooi i Sybesma, 1988; Wotton, Anil, Whittington i McKinstry, 1992; Velarde *et al.*, 2002). Segons Velarde *et al.* (2000), aquests problemes de qualitat de la carn i de la canal poden evitar-se parcialment amb l'aplicació del tercer elèctrode a la zona de projecció del cor. Aquest mètode permet reduir la incidència de carn PSE (Grandin, 1985) a causa de la reducció de la intensitat de les convulsions clòniques (Gilbert, Devine, Hand i Ellery, 1984) així com les hemorràgies a la canal (Velarde *et al.*, 2001).

### 2.1.3 Atordiment per exposició a altes concentracions de CO<sub>2</sub>

El CO<sub>2</sub> és un gas que en ser inhalat causa la pèrdua de la consciència sense deixar residus nocius a la canal per a la salut dels consumidors. Aquest mètode consisteix a abaixar els animals amb una gàbia dins d'un pou que contingui una concentració elevada de CO<sub>2</sub> durant un temps suficient que permeti induir-los a la pèrdua de la consciència al fins que es morin per dessagnament (Reglament —CE— 1099/2009). Un cop atordits, els animals són apujats altre cop a la superfície i sacrificats mitjançant la secció del tronc braquiocefàlic.

A causa de les seves característiques, la utilització de CO<sub>2</sub> als escorxadors presenta diversos avantatges. Per una banda, la concentració normal de CO<sub>2</sub> a l'atmosfera és de 0,03 % en volum. Tot i aquesta escassetat, és un gas barat i fàcilment disponible com a producte secundari de la indústria química (Raj, 2004). Per l'altra, en condicions normals (27 °C a 1 atm.) el CO<sub>2</sub> és 1,5 vegades més dens que l'aire atmosfèric (Kettlewell, 1986) la qual cosa facilita el seu emmagatzematge a l'interior d'un pou.

Existeixen dos mecanismes diferents per introduir els animals a l'interior del pou. El sistema *Diplift* funciona com un ascensor en què els animals són carregats en grups de màxim quatre i introduïts a l'interior del pou. Quan ha transcorregut el temps necessari, la gàbia torna a pujar a la superfície. El sistema *Paternoster* està constituït per diferents gàbies, de manera similar a una roda, que van carregant grups d'animals (entre 4 i 6 els aparells més nous) i introduint-los a l'interior del pou de manera esglaonada al mateix temps que es van descarregant els que ja estan inconscients. Al llarg del trajecte cada gàbia va efectuant parades en diferents estrats del pou.

Els sistemes més moderns d'atordiment amb CO<sub>2</sub> permeten que l'entrada dels animals es dugui a terme en grups i sense la intervenció de persones. Amb aquest sistema no és necessària la subjecció de l'animal durant el procés d'atordiment, la qual cosa permet disminuir l'estrès anterior al sacrifici (Velarde *et al.*, 2000; EFSA, 2004). D'altra banda, també disminueix la intensitat de la fase excitatòria muscular, de manera que es redueix la incidència de carns PSE respecte a l'atordiment elèctric (Velarde *et al.*, 2002). Aquests resultats van ser confirmats per Channon *et al.* (2003) en un estudi en què es va comparar l'electronarcosi (1,3 A durant 4 s) amb l'atordiment amb gas (90 % de CO<sub>2</sub> de 103 s). Es va trobar que la prevalença de la carn PSE i petèquies a la canal va ser significativament més baixa amb l'atordiment per gas.

Totes aquestes millores a la qualitat de la carn i de la canal han fet que l'atordiment amb gas sigui el mètode d'elecció en molts escorxadors comercials (Velarde *et al.*, 2000).

### 2.1.3.1 *Processos fisiològics derivats de la inhalació de CO<sub>2</sub>*

La pèrdua de la consciència durant la inhalació de CO<sub>2</sub> es produeix per una depressió de la funció neuronal a conseqüència d'una hipòxia hipercàpnica i una disminució del pH tissular al sistema nerviós central (Roughton, 1964). El CO<sub>2</sub> entra a través de les vies respiratòries i es distribueix per l'organisme gràcies a un gradient de difusió.

A mesura que augmenta la concentració de CO<sub>2</sub> a la sang, es produeix la saturació del transport d'aquest gas per part de l'hemoglobina. Això provoca que el CO<sub>2</sub> quedi lliure i sigui absorbit pels eritròcits. Dins d'aquestes cèl·lules, gràcies a l'acció de l'anhidrasa carbònica, reacciona amb l'aigua (H<sub>2</sub>O) i produeix àcid carbònic (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), una part del qual, seguidament, es dissocia en ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup>. L'augment de la concentració de protons (H<sup>+</sup>) causa una baixada del pH de la sang. Al líquid cefaloraquídi també es produeix una disminució del pH, del 7,4 al 6,8, gràcies a un intercanvi de protons a la barrera hematoencefàlica (Raj, 1999). Això provoca una supressió de l'activitat neuronal de l'SNC, un efecte anestèsic (Eisele *et al.*, 1967) i analgèsic (Mischler *et al.*, 1996) quan el pH arriba al 7,1 i 6,8 respectivament (EFSA, 2004). Durant aquesta fase, l'animal perd successivament la capacitat de mantenir-se dempeus, desapareix el reflex corneal, la sensibilitat al dolor i la ritmicitat respiratòria, la qual cosa condueix a la mort de l'animal.

De manera paral·lela, existeix certa evidència que la inhibició neuronal induïda pel diòxid de carboni pot ser causa d'un alliberament excessiu d'àcid gamma-aminobutíric (GABA) al cervell (Cook, 1999). En condicions normals aquest aminoàcid inhibitori, juntament amb altres aminoàcids excitadors, regula la funció neuronal per evitar l'epilèpsia (Meldrum, 1984). Quan la secreció d'aquest neurotransmissor a l'espai intercel·lular és excessiva, indueix un bloqueig neuronal i una depressió de l'activitat cerebral.

### 2.1.3.2 *Inconsciència per inhalació de CO<sub>2</sub>*

La inhalació de CO<sub>2</sub> no provoca una pèrdua de consciència immediata. Amb un 90 % de CO<sub>2</sub> l'anestèsia comença entre 15±3 s més tard de l'inici d'exposició (Raj i Gregory, 1997), i s'allarga quan se'n disminueix la concentració (Raj i Gregory, 1996). De fet, el

temps necessari per perdre la consciència en porcs està relacionat amb la concentració atmosfèrica del diòxid de carboni, de manera que com més concentració de CO<sub>2</sub> hi hagi més ràpida és la pèrdua de la consciència. A banda d'això, investigacions preliminars han demostrat que una ràpida immersió a altes concentracions de diòxid de carboni redueix el temps de pèrdua del coneixement, indicat per la pèrdua de la postura, en comparació amb la immersions més lentes (Barton-Gade, 1999).

La depressió neuronal, durant la qual es produeix la pèrdua de la postura, de la sensibilitat al dolor i dels reflexos del tronc cerebral, com el reflex corneal i el ritme respiratori (Holst, 2001), va seguida, en alguns animals, d'una fase d'excitació amb espasmes musculars intensos. Alguns autors consideren que aquestes espasmes transcorren en estat d'inconsciència i, per tant, es tracta d'un quadre convulsiu (Forslid, 1982; 1987), mentre que altres afirmen que el moment de la pèrdua de la consciència és posterior a l'inici d'aquesta fase (Hoenderken, 1983) (taula 1).

Zeller, Schatzmann i Imhof (1987) van estudiar les convulsions que pateixen els porcs quan són atordits amb CO<sub>2</sub>, i suggereixen que part dels episodis convulsius transcorren en la fase d'excitació, mentre els porcs estan conscients. De la mateixa manera, Prändl *et al.* (1994) van demostrar, a través d'estudis d'electroencefalografia (EEG), que els animals atordits amb CO<sub>2</sub> perdien el coneixement després de l'excitació prolongada, uns 40 s després de l'inici de l'exposició al gas. Estudis recents duts a terme a l'IRTA, que avaluaven la consciència mitjançant l'EEG i els potencials evocats auditius, demostren que els espasmes musculars comencen abans que l'animal perdi la consciència (Rodríguez *et al.*, 2008).

**Taula 1. Temps (s) de pèrdua de la consciència determinat per diferents mètodes després de l'exposició a diferents concentracions de CO<sub>2</sub>**

Concentració de CO <sub>2</sub> (%)	Temps de pèrdua de la consciència			Referència
	Pèrdua de la sensibilitat (EEG)	Pèrdua de la resposta cerebral (AEP/SEP)	Pèrdua de la postura	
95	11,8±0,3			Forslid, 1992
90		14		Martoft <i>et al.</i> , 2001
90			15±3	Raj i Gregory, 1996
85			22±2	Holst, 2002
80	21-30			Forslid, 1987
80	15-20			Ring <i>et al.</i> , 1988
80		21,2±6,5		Raj <i>et al.</i> , 1997a
80			22±6	Raj i Gregory, 1996
76-80			26±6	Dodman, 1977
75			25±3	Holst, 2002
71-75			29	Dodman, 1977
70			17±4	Raj i Gregory, 1996
66-70			34±9	Dodman, 1977
65			27±3	Holst, 2002
61-65			38	Dodman, 1977
60			25±2	Raj i Gregory, 1996
55			32±4	Holst 2002
50			34±8	Raj i Gregory, 1996

S'ha descrit que un període superior a cinc minuts i mig en una concentració atmosfèrica del 90 % provoca la mort de l'animal (Holst, 1999). Si l'exposició al CO<sub>2</sub> no es manté fins a la mort de l'animal, es produeix un estat d'inconsciència reversible

que ha de mantenir-se fins a la mort de l'animal per dessagnament. El temps d'inconsciència un cop l'animal surt del sistema d'atordiment augmenta en relació amb l'augment de la concentració de CO<sub>2</sub> i el temps d'exposició (Holst, 2001).

### 2.1.3.3 Aversió al CO<sub>2</sub>

L'aversió és una tendència a mostrar un comportament per evitar una situació que està associada a un estímul nociu (EFSA, 2004). En humans, la inhalació d'altres concentracions de CO<sub>2</sub> causa irritació de les vies respiratòries i una sensació de falta d'aire (Gregory *et al.*, 1990). En un estudi dut a terme en rates, es va observar que aquests animals eviten concentracions superiors al 3 % d'aquest gas (Kirkden *et al.*, 2008). Al llarg del tracte respiratori tenen quimiorceptors que detecten el CO<sub>2</sub>. A les vies respiratòries superiors aquests quimiorceptors són nociceptors, és a dir, la seva activació provoca dolor a més a més d'ansietat i malestar (Troeger i Waltersdorf, 1991).

En porcs, són nombrosos els estudis que han demostrat que l'exposició a elevades concentracions de CO<sub>2</sub> provoca aversió (Cantieni, 1976; Raj i Gregory, 1995; Velarde *et al.*, 2007). Segons Dodman (1977), la primera reacció d'un porc davant d'una situació desagradable és retrocedir. Aquest mateix autor va observar que un 60 % dels porcs que havien estat sotmesos a unes concentracions d'entre el 50 % i el 80 % de CO<sub>2</sub> retrocedien però que, a mesura que augmentava la concentració de CO<sub>2</sub>, la incidència d'aquest comportament disminuïa. Vint-i-cinc anys més tard, Holst (2002) va obtenir els mateixos resultats i, gràcies als coneixements obtinguts en els darrers anys en relació amb els efectes analgèsics del CO<sub>2</sub> (Mischler *et al.*, 1994; 1996), va establir que aquesta baixa freqüència de retrocessos podia ser causada per un major efecte analgèsic del CO<sub>2</sub> en elevades concentracions.

Un altre indicador de l'aversió durant la inhalació de CO<sub>2</sub> són els intents d'escapada (Raj i Gregory, 1996; Velarde *et al.*, 2007). En aquest cas, els resultats obtinguts no són concloents. Mentre que Holst (2002) i Raj i Gregory (1996) van observar que davant d'una concentració elevada (> 70 %) de CO<sub>2</sub>, el 5 % o menys dels animals intenten escapar, segons Velarde (2007), aquest comportament es donarà en un 35 % dels animals exposats al 70 % de CO<sub>2</sub> i en un 77 % dels exposats al 90 % de CO<sub>2</sub>. Així doncs, a mesura que augmenta la concentració de CO<sub>2</sub>, la resposta d'aversió augmenta (Velarde *et al.*, 2007) però també ho fa l'efecte analgèsic, el qual emmascarava la resposta aversiva.

La inhalació d'elevades concentracions de CO<sub>2</sub> provoca una sensació de falta d'aire similar a la que es produeix després d'un exercici físic intens (Raj, 2008). La sensació de falta d'aire, tot i que no és un signe d'aversion, es considera que afecta negativament el benestar animal (Velarde *et al.*, 2007). Un signe evident de l'inici de la sensació de falta d'aire és el panteix (Raj i Gregory, 1996). Es tracta d'un comportament reflex causat per l'activitat medul·lar residual al tronc cerebral durant l'exposició a una atmosfera hipercàpnica (Gregory, 2004), que es basa en l'extensió del coll cap amunt i l'obertura de la boca com si l'animal estigués cercant aire per respirar (EFSA, 2004). Velarde *et al.* (2007) van observar que tots els animals exposats tant a un 70 % de CO<sub>2</sub> com a un 90 % mostraven panteix en algun moment de l'exposició al gas. Aquest fet s'explica perquè la inhalació de CO<sub>2</sub> provoca una hiperventilació creixent per efecte de l'estimulació dels quimiorceptors de CO<sub>2</sub> quan la pressió parcial d'aquest gas a la sang augmenta (Ganong, 1998).

Resumint, tal com apunta Gregory (1994), tots aquests efectes sobre l'animal són suficients perquè pugui ser declarat com un sistema d'atordiment aversiu. En aquest sentit, el Farm Animal Welfare Council (organisme que vetlla pel benestar dels animals de granja al Regne Unit), el 2003 va recomanar que s'abolís el sistema d'atordiment per inhalació d'elevades concentracions de CO<sub>2</sub> en els propers anys (Raj, 2008).

### 3 GASOS ALTERNATIUS AL CO<sub>2</sub>

Existeixen múltiples mètodes d'atordiment per mitjà de gasos diferents del CO<sub>2</sub>, com ara el monòxid de carboni (CO), l'àcid cianhídric (HCN), l'òxid nítrós (NO<sub>2</sub>), el nitrogen (N<sub>2</sub>) o l'argó (Ar). Tots provoquen un estat d'anòxia per diferents processos, que es tradueix en un dèficit d'oxigen a les neurones i una fallida neuronal. El monòxid de carboni té una afinitat amb l'hemoglobina superior a la que aquesta proteïna transportadora té amb l'oxigen, la qual cosa provoca la baixada de la seva concentració a la sang. L'àcid cianhídric dificulta la perfusió de l'oxigen sanguini als teixits (Kennedy *et al.*, 1992). L'òxid nítrós és un antagonista dels receptors del *N*-metil-D-aspartat (NMDA) i d'alguns receptors colinèrgics que es troben a les neurones (Yamakura i Harris, 2000).

Aquests gasos, però, són molt tòxics i fins i tot en concentracions molt baixes podrien representar un risc tant per als treballadors dels escorxadors com per als animals, així que el seu ús està desestimat en condicions comercials.



### 3.1 Gasos inerts

Una elevada concentració d'un gas inert provoca el desplaçament de l'oxigen atmosfèric, la qual cosa fa que la seva concentració pugui disminuir fins a nivells molt baixos (< 2 %). A l'organisme, enfront de la falta d'O<sub>2</sub> es produeix un alentiment del metabolisme fins que s'esgoten els substrats que permetran la formació de molècules energètiques com l'adenosinatrifosfat (ATP). Els canals de transport de ions de la cèl·lula, el més important dels quals és la bomba sodi i de potassi, es veuen bloquejats per la falta d'energia i es produeix una acumulació de potassi extracel·lular que provoca la despolarització de la cèl·lula.

Com que l'SNC és un dels teixits més sensibles a la falta d'O<sub>2</sub>, aquests efectes poden ocórrer en qüestió de molt pocs segons d'inhalació de qualsevol atmosfera anòxica. No obstant això, s'ha de tenir en compte que el temps de supervivència de les neurones situades en diferents parts del cervell pot variar d'acord amb la taxa de consum d'oxigen de cada zona (Raj, 2004). A tall d'exemple, el temps de supervivència de l'escorça cerebral és considerablement més curt que el de la medul·la, on es troba el centre respiratori. D'aquesta manera, la sensibilitat, que depèn del còrtex cerebral, serà una de les primeres funcions a desaparèixer (Raj, 2004).

Existeixen evidències científiques que l'anòxia, juntament amb els efectes de la despolarització neuronal sobre l'SNC, també provoca la inactivació dels canals receptors d'NMDA, essencials per mantenir l'excitació neuronal en estat conscient (EFSA, 2004). Un bon exemple d'això és que els efectes d'una sèrie d'analgèsics, sedants i anestèsics moderns són conduïts pels canals dels receptors d'NMDA al cervell.

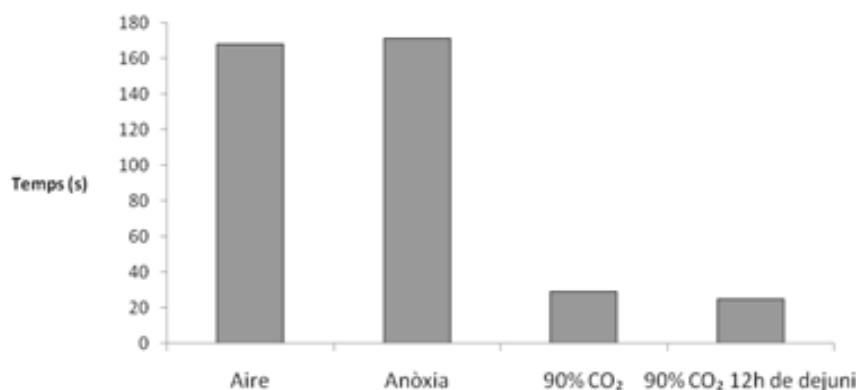
La recuperació de la consciència es produeix molt ràpidament, de manera que als animals atordits per anòxia se'ls administra oxigen o se'ls permet respirar aire atmosfèric. Així, l'activitat normal del cervell pot restaurar-se en pocs segons (Raj, 2004).

Diversos autors han demostrat que es pot provocar un atordiment per inhalació de gasos inerts sense causar aversió als porcs (Raj i Gregory, 1995; Raj i Gregory, 1996; Troeger, 2003; Dalmau *et al.*, 2010b). Si bé existeixen gasos inerts (inodors i sense gust), com el xenó i el criptó que tenen propietats anestèsiques (Hill i Ray, 1977), tant l'argó com el nitrogen poden produir una ràpida pèrdua de la consciència per efectes d'una anòxia cerebral. L'avantatge d'aquests dos gasos respecte als que s'esmentaven a l'inici

d'aquest paràgraf és que estan presents a l'atmosfera, de manera que en baixes concentracions no representen un problema de salut per als treballadors ni per als animals.

L'administració d'elevades concentracions de gasos inerts com l'argó o el nitrogen provoca un desplaçament de l'oxigen de l'aire fent-ne disminuir la concentració atmosfèrica. La inhalació d'una atmosfera amb una concentració d'O<sub>2</sub> inferior al 2 % fa disminuir l'aportació d'aquest gas a l'organisme la qual cosa provoca l'anòxia.

L'anòxia no és el mateix que l'asfíxia. Aquesta darrera comporta una separació física de les vies respiratòries superiors amb l'atmosfera i provoca inevitablement dolor i estrès (Raj, 2008). D'altra banda, l'anòxia mitjançant la inhalació d'altres concentracions d'un gas inert amb menys d'un 2 % d'O<sub>2</sub> s'ha considerat com una manera agradable de perdre la consciència en els éssers humans (Gregory, 1993) i en animals el seu ús està recomanat per a l'eutanàsia (Ernsting, 1963, 1965). Per confirmar aquesta hipòtesi, en un estudi es va proporcionar accés a menjar (pomes) dins d'una zona l'atmosfera de la qual es podia modificar. Es va detectar que, quan s'oferia als porcs menjar pomes dins una atmosfera d'anòxia, la majoria perdia la consciència abans de retirar-se i que cap animal patia hiperventilació. En canvi, els porcs sotmesos a una atmosfera amb el 90 % de CO<sub>2</sub> es retiraven al cap de poc temps (figura 3) (Raj i Gregory, 1995).



**Figura 3. Temps que van tardar els animals a retirar-se de la zona d'alimentació quan aquesta contenia una atmosfera d'aire, una atmosfera que provocava anòxia mitjançant gasos inerts, una atmosfera que provocava hipercàpnia (90 % CO<sub>2</sub>) i una atmosfera que provocava hipercàpnia havent estat dejunats 12 hores abans.**

En un treball fet a l'IRTA, en el qual els porcs eren exposats repetidament (10 sessions) a mescles de gasos que contenien diferents concentracions de CO<sub>2</sub>, argó i nitrogen, es va determinar que, des del punt de vista del benestar animal, la inhalació menys aversiva

era la que no contenia CO<sub>2</sub> (composta per un 90% d'argó en aire) (Dalmau *et al.*, 2010b).

### 3.1.1 L'argó

Per provocar la inconsciència per anòxia, un dels gasos més utilitzats és l'argó ja que és un gas inert que, a causa del seu elevat pes molecular, és fàcilment emmagatzemable dins d'un pou obert. No obstant això, el temps d'inducció de la inconsciència, registrat mitjançant l'EEG, és superior en animals atordits per anòxia (argó) (54 s) que per hipercàpnia (32 s) (Raj *et al.*, 1997). A més, en un estudi posterior es va observar que la majoria d'animals mostraven una fase d'espasmes musculars cap al moment en què es produïa la pèrdua de la postura i que es perllongava durant més temps en animals atordits per anòxia que amb CO<sub>2</sub> (Dalmau *et al.*, 2010b). Aquests espasmes, que van des dels moviments enèrgics similars als de córrer i saltar fins a les convulsions clòniques (Dodman, 1977), han estat objecte de controvèrsia amb referència a l'estat de consciència de l'animal quan apareixen. Zeller *et al.* (1987), Raj *et al.*, (1997) i Rodríguez *et al.* (2008) afirmen que els porcs podrien estar conscients durant l'exhibició dels espasmes musculars que es donen en el procés d'inducció a la inconsciència amb diferents mescules de gasos. De fet, els mateixos autors suggereixen que podria ser una resposta aversiva a la dificultat respiratòria induïda pel gas, a diferència de les convulsions que suggereix Forslid (1987), les quals per definició transcorren en estat d'inconsciència.

Per reduir el temps d'inducció a la inconsciència i la intensitat dels espasmes musculars, diversos estudis han demostrat la utilitat d'incorporar CO<sub>2</sub> al gas (EFSA, 2004). Així, s'aconsegueix que la hipercàpnia tingui un efecte additiu sobre l'anòxia i s'obté una inducció de la inconsciència més ràpida (Raj *et al.*, 1997). Tanmateix, si volem mantenir els beneficis dels gasos inerts sobre l'aversion, la incorporació de CO<sub>2</sub> no pot ser il·limitada. Segons Raj i Gregory (1995), la inhalació d'una concentració de CO<sub>2</sub> superior al 30 % provoca una resposta d'aversion en la majoria de porcs, la qual cosa marcarà el percentatge límit a utilitzar. Segons Gregory (1995) l'exposició a baixes concentracions de CO<sub>2</sub> (30 %) juntament amb menys d'un 2 % d'oxigen provoca una anòxia hipercàpnica i causa una pèrdua de la consciència més ràpida que amb anòxia (Gregory, 1995).

Tot i els bons resultats de l'argó en el manteniment del benestar animal, aquest gas presenta un problema en l'aplicació en condicions comercials. L'argó és un gas amb baixa presència a l'atmosfera (0,9 %) i la seva disponibilitat per a l'atordiment en condicions comercials pot ser limitat (Dalmau *et al.*, 2010a), per la qual cosa se'n desestima el seu ús.

### 3.1.2 El nitrogen

Alguns estudis suggereixen que el nitrogen permet obtenir resultats similars a l'argó (Raj *et al.*, 1997; Raj, 1999; Dalmau *et al.*, 2010b), ja que es tracta també d'un gas inert, que permet desplaçar l'oxigen fins a arribar a concentracions inferiors al 2 % de volum atmosfèric. L'avantatge respecte de l'argó és que el preu és més baix perquè el nitrogen té una presència majoritària a l'atmosfera (79 %).

El problema del nitrogen però, és que la seva densitat relativa (0,97) és lleugerament més baixa que l'aire i la seva estabilitat, definida com la capacitat del gas perquè es mantingui dins de la fossa sense ser desplaçat per l'oxigen, és baixa (Dalmau *et al.*, 2010a). Aquest problema es podria resoldre altre cop si es combina el nitrogen amb el CO<sub>2</sub>. Com que el CO<sub>2</sub> té una densitat més alta que el nitrogen i que l'aire, la seva incorporació proporciona una major densitat a la mescla. Com més gran sigui la concentració de CO<sub>2</sub> afegit al nitrogen, més gran serà la densitat relativa de la mescla i, per tant, més fàcil serà desplaçar l'oxigen a la fossa. Aquesta hipòtesi va poder ser confirmada en un estudi fet a les instal·lacions de l'IRTA on es va veure que definitivament, la barreja de nitrogen amb CO<sub>2</sub> millorava la contenibilitat ja que augmenta el pes molecular del gas (Dalmau *et al.*, 2010a). A més, tal com passava amb l'argó, aquest estudi va indicar que la utilització de mescles del 15 % al 30 % de CO<sub>2</sub> amb un 70-85 % de nitrogen provoquen una pèrdua més ràpida de la consciència i una fase més curta d'espasmes musculars que en elevades concentracions d'argó (Dalmau *et al.*, 2010b).

#### 3.1.2.1 *Qualitat de la canal i de la carn*

La possible aplicació de l'atordiment mitjançant la hipòxia hipercàpnica en escorxadors comercials dependrà del benestar animal, però també dels seus efectes sobre la qualitat de la carn i de la canal (figura 4). Se sap que la qualitat de la carn està altament influenciada pel comportament i la resposta fisiològica dels animals abans del seu sacrifici (Cannon, 1996).

Amb la mort de l'animal, el reg sanguini del múscul s'atura amb la conseqüent aturada de l'aportació d'oxigen als òrgans i les cèl·lules. Davant la falta d'oxigen i amb l'objectiu de mantenir l'homeòstasi, s'inicia el metabolisme anaerobi, en què es produirà una gran quantitat d'àcid làctic i hi haurà una acidificació del medi intracel·lular. En condicions normals, l'àcid làctic és transportat dels músculs al fetge on la glucosa es resintetitza a glucogen, o al cor, on es metabolitza a diòxid de carboni (CO<sub>2</sub>) i aigua (Warris, 2000). Tanmateix, durant el dessagnament, el sistema circulatori és incapaç de reciclar aquest metabòlit i l'àcid làctic es va acumulant al múscul, per la qual cosa baixa el valor de pH muscular (Kastenschmidt *et al.*, 1968; Warris, 2000). Precisament, la rapidesa i la magnitud del metabolisme energètic i l'acidificació del múscul tenen un paper clau en la conversió de múscul a carn, i són importants per determinar les característiques relacionades amb la qualitat tecnològica de la carn fresca de porc (Briskey, 1964; Offer i Knight, 1988). Durant les hores immediatament posteriors a la mort, el pH muscular disminueix de valors 7,0-7,2 (pH fisiològic) fins a valors 5,4-5,7 (Warris, 2000).

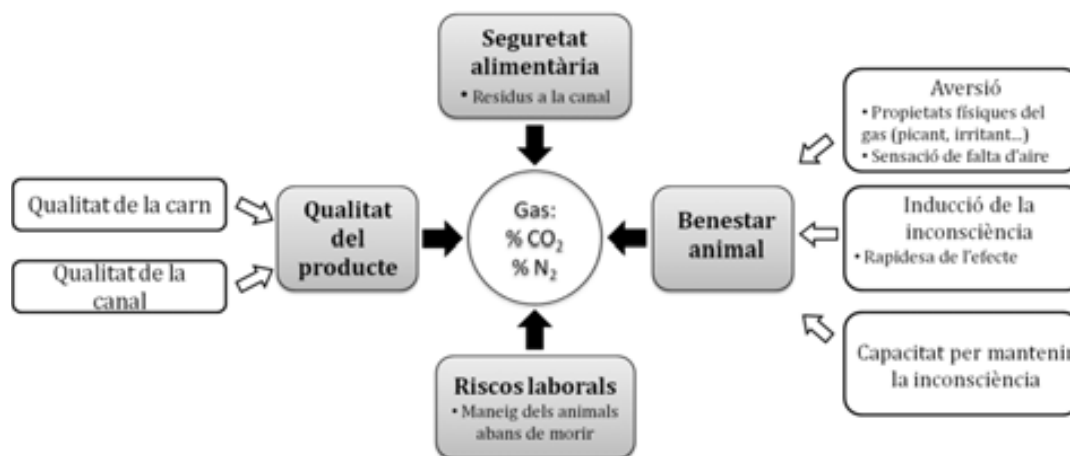
El pH i la temperatura muscular *post mortem* afectaran la velocitat i magnitud de la desnaturalització proteica, el color, la capacitat de retenció d'aigua i les característiques sensorials de la carn (Rosenvold i Andersen, 2003).

Segons Bertram *et al.* (2002), elevats nivells d'estrès moments abans de la pèrdua de la consciència tenen un efecte notable sobre el metabolisme *post mortem* del fòsfor, fan augmentar la velocitat de disminució del pH *post mortem* i disminuir la capacitat final de retenció d'aigua de la carn. Aquestes alteracions del procés de conversió de múscul en carn s'associen a una carn pàl·lida, tova i exsudativa (en anglès *pale, soft and exudative*; PSE) (Monin, 1988; D'Souza *et al.*, 1999 i Terlow, 2005). Tenint en compte els suggeriments de Raj i Gregory (1995), un atordiment amb mesclures de gasos compostes per nitrogen i un màxim de 30 % de CO<sub>2</sub> (hipòxia hipercàpnica) induiria a una menor aversió que en comparació amb el 90 % de CO<sub>2</sub> (hipercàpnia). Es pot esperar una millora en la qualitat de la carn respecte a l'atordiment amb CO<sub>2</sub>.

Això no obstant, Troeger *et al.*, (2005) va demostrar que, en condicions experimentals, els porcs atordits amb mesclures d'argó i CO<sub>2</sub> amb baixes concentracions d'O<sub>2</sub> mostren una fase d'excitació muscular més llarga i més intensa en comparació amb els porcs exposats a altes concentracions de CO<sub>2</sub>. Convé fer ressaltar que les contraccions musculars durant i després de l'atordiment tenen un efecte negatiu en la qualitat de la

carn, perquè causen una caiguda més ràpida del pH i una reducció de la capacitat de retenció de l'aigua (Van der Wal *et al.*, 1997).

A dia d'avui no existeixen estudis que hagin provat l'efecte de l'atordiment de porcs sobre la qualitat de la canal i de la carn utilitzant elevades concentracions de nitrogen combinades amb menys d'un 30 % de CO<sub>2</sub>. Es desconeix, doncs, l'efecte que pot tenir la disminució de l'aversió així com una fase d'excitació muscular més llarga, en el cas que aparegui, sobre la qualitat del producte final.



**Figura 4. Arbre de decisió dels aspectes que afecten l'elecció d'una barreja de gasos per a l'atordiment**

#### 4 AVALUACIÓ DEL BENESTAR ANIMAL DURANT EL SACRIFICI

En els darrers anys s'ha demostrat que les mesures de benestar que millor reflecteixen el benestar d'un animal són les mesures basades en l'animal (Whay *et al.*, 2003). La percepció de qualsevol estímul ambiental sobre un animal comportarà una resposta adaptativa que pot ser fisiològica o de comportament. L'avaluació d'aquestes respostes poden ajudar a conèixer el grau de benestar en què es troba un animal. A tall d'exemple, per conèixer com un animal percep determinat estímul dolorós podrem mesurar la rapidesa amb què l'animal defuig l'estímul o la intensitat amb la qual l'intenta defugir. D'altra banda, mesures fisiològiques com l'activitat cerebral o bé la secreció de determinades hormones també permeten conèixer la intensitat del dolor que l'animal ha sentit.

Durant el sacrifici són diversos els moments en què el benestar animal pot veure's compromès. En primer lloc, si el mètode d'atordiment no és indolor i no provoca una pèrdua de la consciència instantània, l'animal pot sentir dolor o angoixa. En aquest cas,

per conèixer en quin grau el benestar animal es pot veure afectat cal avaluar tant el grau d'aversió al mètode d'atordiment com el temps que transcorre fins a la pèrdua de la consciència. En segon lloc, en el cas d'un atordiment reversible, una recuperació de la consciència anterior a la mort per dessagnament comportaria que l'animal percebés el dolor provocat per la incisió. Convindria determinar el temps que es manté la inconsciència després de l'atordiment. Finalment, una manera per determinar l'estrès que ha sofert l'animal durant tot el procés de sacrifici és la mesura de la qualitat de la carn tenint en compte que aquesta respon a una sèrie de processos metabòlics que tenen lloc a la musculatura.

#### **4.1 Mesura de l'aversió**

Les motivacions d'un animal poden ser positives, com el desig de consumir un producte o de dur a terme un comportament, o negatives (per exemple, evitar un estímul nociu). Les positives poden ser definides com a motivacions agradables mentre que les negatives es poden anomenar també aversives (Masterson i Crawford, 1982; Lang *et al.*, 1990). L'aversió, doncs, és la tendència a evitar un determinat recurs o estímul.

Hi ha dos enfocaments principals per a l'avaluació de les emocions. El primer consisteix a proporcionar a l'animal algun control sobre el medi que l'envolta i observar les decisions que pren (test de selecció). L'altre, definit com a test de motivació, consisteix en l'observació de les respostes dels animals quan són exposats a un entorn sense possibilitat de modificar-lo (Kirkeden i Pajor, 2006). La base dels tests de motivació és que l'animal es veu obligat a pagar un preu (per exemple, en forma de treball o de pèrdua d'un altre recurs) per accedir al recurs d'interès (Duncan, 1992; Fraser i Matthews, 1997). Però per determinar el grau de motivació cal quantificar el preu que representa per a l'animal, la qual cosa s'aconsegueix mitjançant la comparació amb un recurs de valor conegut (Kirkeden i Pajor, 2006).

Un tipus de test de motivació són els tests d'aversió, els quals poden ser positius o negatius. En els positius l'animal és entrenat per dur a terme una resposta davant un recurs positiu, llavors s'elimina l'estímul positiu i es mesura la possible disminució de la resposta (Petherick *et al.*, 1992; Rutter i Duncan, 1992; Jones *et al.*, 1998). En la variant negativa, els subjectes es veuen sotmesos a un estímul nociu sense haver estat entrenats prèviament i es mesura la seva motivació o rebuig per avançar cap a l'estímul (Rushen i Congdon, 1987; Hargreaves i Hutson, 1990; Pajor *et al.*, 2000).

Convé subratllar que un animal, davant d'una experiència desagradable, durà a terme una sèrie de canvis en la fisiologia i el comportament amb la finalitat de minimitzar o evitar més perjudicis, reduir la probabilitat de repetir l'experiència i garantir la recuperació dels danys ocasionats. Així, un comportament afectat negativament per una experiència desagradable proporciona evidència de la naturalesa de l'estímul aversiu.

La magnitud de les respostes comportamentals pot ser quantificada objectivament i això pot utilitzar-se per inferir el grau d'aversió (Rushen, 1986). Existeixen diferents mesures per quantificar l'aversió segons Martin i Bateson (1986):

- La latència: especifica el temps que passa fins que es mostra una determinada conducta.
- Presència/absència: percentatge d'animals que expressen una conducta per unitat de temps.
- La durada de la conducta.
- La intensitat de la conducta.

La mesura de la motivació per exposar-se a les condicions d'atordiment en sessions repetides ha estat utilitzada per diferents autors per avaluar el grau d'aversió a l'exposició al CO<sub>2</sub> (Jongman *et al.*, 2000; Velarde *et al.*, 2007 i Dalmau *et al.*, 2010b). De manera específica aquests autors volien quantificar l'aversió que representa per als porcs l'entrada dins d'una gàbia que baixa a l'interior d'un pou així com l'exposició a determinades concentracions de CO<sub>2</sub>. Es van col·locar uns quants porcs, durant repetides sessions, en una gàbia que baixava a un pou. En les primeres sessions el pou contenia aire i posteriorment diferents concentracions de CO<sub>2</sub>. Els autors van prendre els intents de retirada i els intents d'escapada com a comportaments anormals que representaven el grau d'aversió als estímuls avaluats. Per tant, com més presents eren aquestes respostes de comportament més aversiu es considerava l'estímul. A més, també es va anotar el temps que van tardar a entrar a la gàbia tenint en compte que aquest és proporcional al grau d'aversió que tenen els animals al descens de la gàbia i/o al gas.

### **4.2 Mesura de la inconsciència**

Per determinar l'efectivitat d'un sistema d'atordiment cal un mètode fàcil, fiable i no invasiu que permeti l'avaluació de l'estat de consciència dels animals durant el seu atordiment. Aquesta avaluació es pot dur a terme mitjançant diferents sistemes.



#### 4.2.1 Mètodes basats en l'EEG

L'EEG o electrocorticograma (ECoG) és un sistema de registre de les variacions de potencial del còrtex cerebral que s'usa per determinar els canvis en l'activitat del cervell i de la consciència en éssers humans i animals. L'amplitud i la freqüència de les ones es relacionen amb el grau de sincronització de les neurones (EFSA, 2004). L'anàlisi visual dels patrons d'ona (amplitud i freqüència) que s'obtenen de l'EEG (Wotton i Gregory, 1986; Martoft *et al.*, 2003; Gerritzen *et al.*, 2008) és un mètode fàcil i ràpid de predir l'activitat cerebral, sempre que sigui dut a terme per un avaluador experimentat. Tot i així, més enllà d'un patró normal o d'un patró isoelèctric, resulta difícil atorgar un grau específic de consciència davant d'un patró concret d'EEG.

Els índexs numèrics objectius són una alternativa a l'avaluació subjectiva de l'EEG, que han estat utilitzats per diversos autors per avaluar la pèrdua del coneixement durant l'atordiment (Raj *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2008). Aquests es basen en l'anàlisi de l'EEG mitjançant un algoritme, diferent segons el sistema, que extrapola d'una manera instantània el grau d'activitat cerebral proporcionant un índex numèric, sovint en una escala de l'1 al 100, que en facilita la interpretació.

Un dels primers sistemes que va ser utilitzat per a l'anàlisi objectiva de l'EEG va ser la transformació ràpida de Fourier (FFT), la qual està basada en l'anàlisi de les freqüències d'ona. Les freqüències d'11 a 42 Hz (beta) han s'associen a la consciència, mentre que les freqüències alfa (de 8 a 13 Hz) s'associen a un estat d'inconsciència causat per la desincronització de l'activitat neuronal. Tanmateix, aquest sistema no proporciona un valor numèric únic i no permet l'extrapolació de l'estat de consciència.

Els potencials evocats auditius (PEA) són un indicador més precís del nivell de consciència que l'anàlisi de l'EEG (Thornton *et al.*, 1989) i que proporciona a la vegada un valor numèric únic. Aquest mètode es basa en l'anàlisi de la resposta cerebral en forma d'ones que representen el processament dels estímuls auditius per part de les estructures auditives del cervell (Martoft *et al.*, 2001). Els PEA s'han utilitzat per avaluar els canvis en l'activitat neuronal i conseqüentment el grau de consciència durant l'anestèsia realitzada en humans (Jensen *et al.*, 1996, 1998; Litvan *et al.*, 2002) i en porcs (Martoft *et al.*, 2002). Paral·lelament, el grau d'activitat isoelèctrica, conegut com a *burst suppression* (% BS), permet fer una millor estimació de la pèrdua de la consciència durant l'anestèsia (Litvan, 2002) i, combinat amb l'anàlisi de l'EEG,

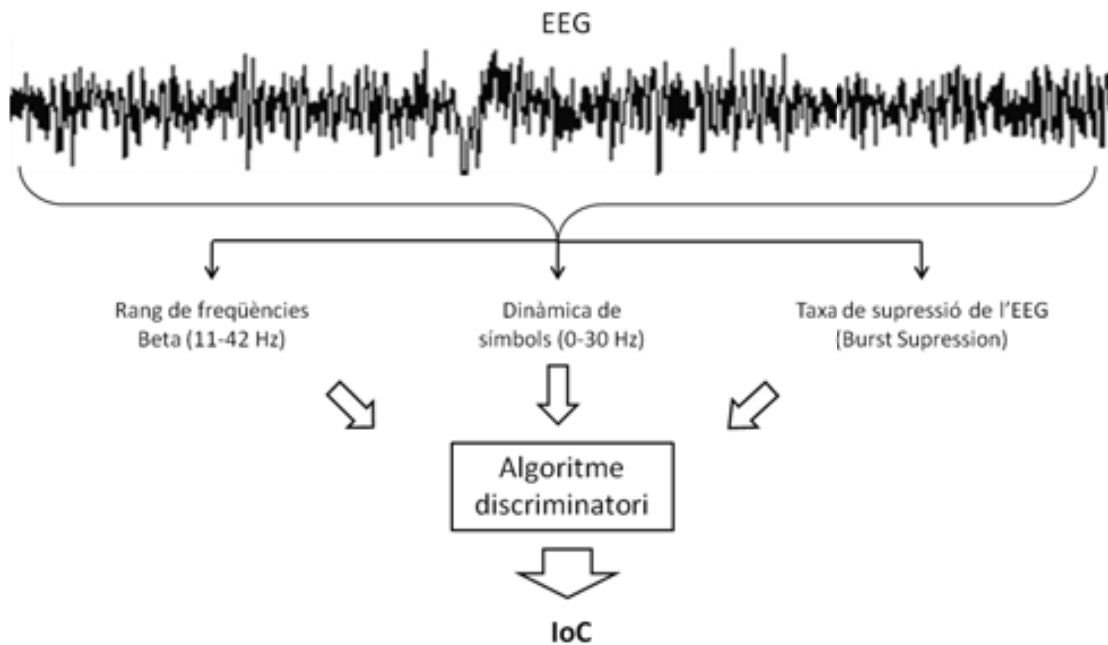
augmenta la fiabilitat del mètode. Per exemple, l'AAI (*A-line ARX index*) és un tipus d'índex numèric objectiu que quantifica les variacions d'amplitud i latència dels PEA així com l'activitat isoelèctrica (% BS) per obtenir un valor numèric amb un rang de 0 a 99 (Jensen, 1999; Litvan *et al.*, 2002). Els valors més alts es relacionen amb la consciència, mentre que una disminució de l'AAI indica una pèrdua gradual de la consciència (Jensen, 1999) fins a arribar a valors nuls que indiquen un estat d'inactivitat cerebral profunda (Guerit, 1999). Tot i la fiabilitat d'aquest mètode, que ha estat extensament utilitzat per a l'avaluació de la profunditat anestèsica en humans i animals, presenta un problema metodològic. La mesura dels potencials evocats comporta que l'individu estigui connectat a uns auriculars que emetran els sons que el cervell ha de processar, la qual cosa, si es duu a terme en animals, presenta certa dificultat.

Recentment han anat apareixent nous índexs numèrics objectius d'anàlisi de l'EEG provinents de la medicina humana que han estat utilitzats en animals, com ara el *Bispectral Index* (BIS) (Martin-Cancho *et al.*, 2006), el *Cerebral State Index* (CSI) (Ribeiro *et al.*, 2009) o l'*Spectral Edge Frequency* (Martin-Cancho *et al.*, 2006). Tots donen índexs de consciència en un rang de 0 a 99 basats en l'anàlisi de diferents paràmetres derivats de l'EEG, com l'electromiograma (EMG), que mesura l'activitat muscular del cap, el % BS i la freqüència i l'amplitud d'ona. Aquests mètodes són més pràctics que els potencials evocats ja que, per obtenir els índexs, n'hi ha prou que es col·loquin dels elèctrodes a l'àrea de projecció del còrtex cerebral de l'os frontal.

L'*Index of Consciousness* (IoC-View<sup>®</sup>, Morpheus Medical, Espanya) és un altre índex numèric objectiu de l'EEG amb escala centesimal que ha estat validat en medicina humana (Revuelta *et al.*, 2008) i en conills (Silva *et al.*, 2011). L'avantatge de l'IoC-view respecte d'altres sistemes d'avaluació de la consciència és que permet l'avaluació de l'activitat cerebral mitjançant connexions sense fil per la qual cosa no és necessari que els animals estiguin immobilitzats mentre són avaluats. A tall d'exemple, per avaluar la consciència durant l'atordiment mitjançant sistemes com els potencials evocats o el BIS, els animals han d'estar immobilitzats, la qual cosa impossibilita que puguin ser exposats a condicions similars a les que es trobarien en condicions comercials, cosa que sí que es pot fer utilitzant l'IoC-view<sup>®</sup>.

En l'IoC, el sistema d'avaluació de l'EEG es basa en la dinàmica de símbols. Aquest mètode divideix els senyals de l'EEG en un nombre finit de particions i les anomena amb un símbol. L'alternança d'aquests símbols és el que es defineix com la dinàmica de

símbols. La dinàmica de símbols detecta la complexitat de l'EEG i la correlaciona amb la profunditat anestèsica. A més de la dinàmica de símbols, l'IoC-*view* també integra la relació de freqüències beta (11-42 Hz) durant l'anestèsia superficial i la intensitat de la supressió de l'EEG (% BS) durant l'anestèsia profunda. La combinació d'aquests tres paràmetres a través d'una funció discriminatòria és el que proporciona l'índex de l'IoC (Revuelta *et al.*, 2008).



**Figura 5. Del registre de l'EEG s'extreuen tres paràmetres, la proporció de beta, la dinàmica de símbols i la taxa de supressió. El mètode que s'utilitza per calcular l'IoC es basa en la integració dels tres paràmetres. Adaptat de Revuelta *et al.* (2008)**

Si bé l'IoC-*view* ha demostrat ser un sistema apte per a la mesura de la consciència en humans i algunes espècies animals, no ha estat mai utilitzat per avaluar-la en porcs. Tanmateix, el porc domèstic ha estat seleccionat com un excel·lent model per a l'experimentació en neurofisiologia, ja que el seu cervell presenta una enorme similitud amb el dels humans (Lind i Moustgaard *et al.*, 2007). Si es recorre el procés invers, un sistema vàlid per a l'avaluació de l'activitat cerebral en humans és probable que també ho sigui per a porcs.

#### 4.2.2 Mètodes basats en el comportament i els reflexos fisiològics

Encara que l'EEG proporciona la informació més fiable de l'activitat cerebral, aquest tipus d'anàlisi requereix una infraestructura i uns coneixements tècnics molt especialitzats que en fan difícil la implementació com a sistema de control als

escorxadors comercials. És per això que s'han intentat trobar altres indicadors més fàcils d'utilitzar en aquestes condicions. Un dels indicadors que s'utilitzen per conèixer l'estat de consciència d'un animal és la seva coordinació motora. Per això, diferents autors han suggerit que la pèrdua de la postura es pot relacionar amb el moment en què es comença a perdre la consciència (Raj *et al.*, 1996; Barton-Gade, 1999; Holst, 2002) que apareix quan les extremitats perden la capacitat de mantenir dempeus l'animal.

El control dels reflexos fisiològics permet l'avaluació de la inconsciència dels animals des de l'atordiment fins a la mort (que es caracteritza per l'absència continuada dels reflexos). Els reflexos més utilitzats són el reflex corneal (Cantieni, 1977; Martoft *et al.*, 2002), la ritmicitat respiratòria i la sensibilitat al dolor (Holst, 2001), ja que són reflexos que depenen del tronc cerebral i en permeten avaluar la funcionalitat. L'avaluació individual de cada reflex no podrà proporcionar informació fiable (Panella *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008) però la combinació de tots permetrà controlar de manera fàcil i fiable l'estat d'inconsciència de l'animal (EFSA, 2004).

El reflex corneal és la resposta de parpelleig davant la pressió sobre la còrnia. La manca de resposta a l'estimulació de la còrnia implica que l'animal es troba en fase anestèsica III o general (Guedel, 1920). Per tant, el fet que els animals atordits no mostrin reflex corneal implica que han assolit la fase d'anestèsia general, o el que és el mateix, d'inconsciència profunda. D'acord amb els resultats de Muir (2007), la pèrdua del reflex corneal es produeix durant la tercera etapa de l'anestèsia, que es caracteritza per la pèrdua del coneixement i per una absència d'excitació i dolor (Von Brandis i Kilian, 1931; Becker, 2005). No obstant això, segons Hall (2001), l'absència de reflex corneal no sempre és un indicador vàlid de la profunditat de l'anestèsia i pot ser present encara que sigui durant un període curt de temps després que es produeixi l'aturada cardíaca.

La ritmicitat respiratòria està regulada pel tronc cerebral, on es troba el centre de control dels moviments respiratoris, i per la medul·la espinal. La lesió d'aquestes estructures implica una rotunda pèrdua de la consciència. Per tant, tal com apuntava Gregory (1998) l'absència d'aquest reflex ens indicarà una depressió neuronal profunda.

Alguns autors han establert que el reflex davant un estímul dolorós és un test fiable de sensibilitat (Anil, 1991; Anil *et al.*, 1997; Grandin, 2009). Aquest mètode consisteix a avaluar la resposta motora de l'animal en aplicar estímuls dolorosos suaus (punxades) sobre qualsevol zona sensible del cos (orelles, espais interdigitals, etc.). La seva

absència està relacionada amb l'absència de sensibilitat però també amb la pèrdua de la consciència.

### 4.3 Mesura de la qualitat de la carn

L'avaluació del grau d'estrès al qual s'ha vist sotmès un animal en el moment previ al sacrifici es pot dur a terme mitjançant l'avaluació dels efectes sobre la qualitat de la canal i de la carn. En aquest sentit, diferents autors han demostrat que un elevat grau d'estrès, el qual afecta directament el benestar d'un animal, en els moments previs al sacrifici, altera la qualitat de la carn (Monin, 1988; Warris *et al.*, 1994; Velarde *et al.*, 2002) a causa d'una modificació del procés bioquímic responsable de la transformació del múscul en carn.

En la resposta d'estrès, hi participa inicialment el sistema simpaticoadrenomedul·lar amb l'alliberació de catecolamines (adrenalina i noradrenalina) al torrent sanguini la qual cosa fa augmentar l'estat d'alerta (Canon, 1935) i entre altres coses afavorirà el metabolisme glicolític de les cèl·lules musculars (Warris, 2000).

Durant el dessagnament de l'animal, l'aportació d'oxigen a la musculatura es veu reduïda. Davant aquesta falta d'oxigen no es pot dur a terme la glucòlisis aeròbia i s'inicia el metabolisme anaerobi, la qual cosa provoca un esgotament de les reserves de glicogen muscular. El subproducte principal de la degradació anaeròbia de la glucosa és l'àcid làctic que, tot i l'acidificació del medi intracel·lular, gràcies a l'energia que genera, permet mantenir la integritat de les cèl·lules durant un cert temps malgrat que la producció d'energia en forma d'ATP sigui menys eficient (Guyton, 1996).

Per l'efecte del dessagnament, el sistema circulatori és incapaç de reciclar aquest metabòlit, de manera que l'àcid làctic es va acumulant al múscul fins que s'esgoten les reserves de glicogen i es redueix el pH muscular (Kastenschmidt *et al.*, 1968; Warris, 2000).



**Figura 6. Diagrama que representa les relacions entre la reactivitat a l'estrès, les condicions de sacrifici i qualitat de la carn. (1) Els nivells d'estrès depenen de: (a) característiques de la situació anterior al sacrifici, (b) els antecedents genètics, (c) l'experiència prèvia. (2) L'estrès percebut provoca respostes de comportament i fisiològiques. L'efecte d'aquestes respostes en el metabolisme del múscle depèn de: (a) l'experiència prèvia de l'animal i (b) els antecedents genètics de l'animal.**

Si en els moments previs al sacrifici l'animal ha patit una situació d'estrès agut, es desencadena una alliberació de catecolamines al torrent sanguini i una despesa energètica excessiva. Com a conseqüència, s'estimula la glucòlisi anaeròbia i la formació d'àcid làctic abans del dessorament, la qual cosa provoca una disminució anòmala i més pronunciada del pH muscular i s'assoleixen, durant la primera hora *post mortem*, valors inferiors a 6 (Monin *et al.*, 1987; Oliver *et al.*, 1993; López Bote, 2001). Aquesta ràpida acidificació, juntament amb una temperatura de la canal encara elevada (> 38 °C) provoca la desnaturalització de les proteïnes musculars (Briskey i Wismer-Pedersen, 1961). Acompanyant aquest fenomen també té lloc una disminució de la capacitat de retenció d'aigua i un augment de la pal·lidesa de la carn (Offer, 1991; Offer i Cousins, 1992). En el bestiar porcí la carn que ha patit aquesta alteració de la maduració sol ser pal·lida, tova i exsudativa, anomenada també carn PSE (de l'anglès *pale, soft and exudative*). A la taula 2 s'especifiquen els criteris de definició d'aquest tipus de carn.

D'aquesta manera, la mesura del pH o, si no es fa, la pèrdua d'aigua i el color de la carn, permetrà inferir l'estrès que ha patit l'animal prèviament al sacrifici i el grau d'afectació del seu benestar.

**Taula 2. Criteris de definició de les característiques de carn PSE segons paràmetres tecnològics (pH, conductivitat elèctrica, pèrdues per degoteig i color)**

	Múscul	Característiques PSE
pH 45 min	LT	$\leq 5,8^1$ $\leq 5,9^2$ $\leq 6,0^{3,4}$
	SM	$\leq 5,8^1$ $\leq 5,9^2$ $\leq 6,0^4$
pH 24 h	LT	-
	SM	-
CEu	LT	$\geq 4,5^7$ $\geq 6,0^2$
	SM	$\geq 4,5^7$ $\geq 6,0^{2,8}$
Pèrdues per degoteig	LT	$\geq 5,0^{9,10,11}$
Color - L*	LT	$\geq 51^9$

PSE: pàl·lides, toves i exsudatives, de l'anglès *pale, soft and exudative*; CEu: conductivitat elèctrica (mS); LT: múscul *Longissimus thoracis*; SM: múscul *Semimembranosus*;

<sup>1</sup> Hofmann, 1988; <sup>2</sup> Barton Gade *et al.*, 1995; <sup>3</sup> Oliver *et al.*, 1988; <sup>4</sup> Smith *et al.*, 1978; <sup>5</sup> Joo *et al.*, 1995; <sup>6</sup> Van der Wal *et al.*, 1988; <sup>7</sup> Kocwin-Podsiadla *et al.*, 2006; <sup>8</sup> Oliver *et al.*, 2001; <sup>9</sup> Warner *et al.*, 1997; <sup>10</sup> Warriss *et al.*, 1989; <sup>11</sup> Kauffman *et al.*, 1993.

Una alteració de la qualitat de la canal també podria demostrar que un animal ha estat sotmès a un estrès agut abans de perdre la consciència. Durant l'atordiment, l'aparició de lesions o petites hemorràgies (petèquies) sovint indiquen que hi ha hagut un període de fortes contraccions musculars (Troeger *et al.*, 2005). Si aquestes contraccions han estat donades per convulsions i, per tant, mentre l'animal estava inconscient, no tindran cap transcendència sobre el benestar (Forslid, 1992). Tanmateix, aquestes fortes contraccions poden ser causa dels intents d'escapada davant d'una situació desagradable, la qual cosa implicaria que el benestar animal queda ressentit (Hoendrecken, 1983; Rodríguez *et al.*, 2008). Per tal de determinar, doncs, si aquestes lesions podrien ser indicadors de falta de benestar, cal conèixer l'estat de consciència en què es troba l'animal durant aquest període d'excitació muscular.



## 5 BIBLIOGRAFIA

- Anil H and Lambooi E (2009) Stunning and slaughter methods In: Smulders FJM and Algers B (Eds.) Welfare of production animals: assessment and management of risks. Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands.
- Anil MH (1991) Studies on the return of physical reflexes in pigs following electrical stunning. *Meat Science* 30: 13-21.
- Anil MH, McKinsty JL and Wotton SB (1997) Electrical stunning and slaughter of pigs. Guidelines for good welfare assurance. *Fleischwirtschaft* 77: 632-635.
- Barnett JL, Hemsworth PH, Cronin GM, Jongman EC and Hutson GD (2001) A review of the welfare issues for sows and piglets in relation to housing. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1-28.
- Barton-Gade PA (1999) Preliminary investigations on the effect of immersion of pigs in carbon dioxide gas. Danish Meat Research Institute. Internal report Ref. 02.703. Unpublished data.
- Bateson P (1991) Assessment of pain in animals. *Animal Behaviour* 42: 827-839.
- Bentham J (1789) An Introduction to the Principles of Morals and Legislation. Clarendon Press: Oxford, UK.
- Bertram HC, Donstrup S, Karlsson AH and Andersen HJ (2002) Continuous distribution analysis of T2 relaxation in meat - An approach in the determination of water-holding capacity. *Meat Science* 60: 279-285.
- Blackmore DK and Delany MW (1988) Slaughter of stock. In: A practical review and guide. Veterinary Continuing Education. Publication 118, Massey University: Palmerston North, New Zealand.
- Blackmore DK, Bowling MC, Madié P, Nutman A, Barnes GRG, Davis AS, Donoghue M and Kirk EJ (1995) The use of shotgun for the emergency slaughter or euthanasia of large mature pigs. *New Zealand Veterinary Journal* 43: 134-137.
- Boissy A, Manteuffel G, Jensen MB, Moe RO, Spruijt B, Keeling LJ, Winckler C, Forkman B, Dimitrov I, Langbein J, Bakken M, Viessier I and Aubert A

- (2007) Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare *Physiology Behaviour* 92: 375–397.
- Briskey EJ and Wiesmer-Pedersen J (1961) Biochemistry of pork muscle structure. I. Rate of anaerobic glycolysis and temperature change versus apparent structure of muscle tissue. *Journal of Food Science* 26: 297–305.
  - Briskey EJ (1964) Etiological status and associated studies of Soft, Pale and Exudative porcine musculature. *Advanced Food Research* 13: 89.
  - Broom DM (2003) *The Evolution of Morality and Religion*. Cambridge University Press: Cambridge, UK.
  - Broom DM and Johnson KG (1993) *Stress and Animal Welfare*. Kluwer Chapman and Hall: Dordrecht, The Netherlands
  - Broom DM (1986) Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal* 142: 524.
  - Cannon JE, Morgan JB, McKeith FK, Smith GC, Sonka S, Heavner J and Meeker DL (1996) Pork chain quality audit survey: quantification of pork quality characteristics. *Journal of Muscle Foods* 7: 29-44.
  - Canon WB (1935) Stresses and strains of homeostasis. *American Journal of Medical Science* 189: 1-14.
  - Cantieni J (1976) Ein Beitrag zur carbon dioxide-Betäubung von Schlachtschweinen. *Schweiz Arch Tierheilk* 119: 255-375.
  - Cantieni VJ (1977) Ein Beitrag Zur CO<sub>2</sub>-Betaubung von Schlachtschweinen. *Schweizer Archive Tierheilkunde* 119: 355-375.
  - Channon HA, Payne AM, Warner RD (2003) Effect of stun duration and current level applied during head to back and head only electrical stunning of pigs on pork quality compared with pigs stunned with CO<sub>2</sub>. *Meat Science* 65: 1325-1333.
  - Cook CJ (1999) Neurological measures to quantify welfare aspects of stunning. In: *Proceedings of the International Workshop on Stunning Systems for Pigs and Animal Welfare*, held during 25-27 August 1999, Billund, Denmark.
  - D’Souza DN, Dunshea FR, Warner RD and Leury BJ (1999) Comparison of different dietary magnesium supplements on pork quality. *Meat Science* 51: 221-225.

- D'Souza DN, Dunshea FR, Warner RD and Leury BJ (1999) Comparison of different dietary magnesium supplements on pork quality. *Meat Science* 51: 221-225.
- Dalmau A, Llonch P, Rodríguez P, Ruíz-de-la-Torre JL, Manteca X and Velarde A (2010a) Stunning pigs with different gas mixtures. Part 1: gas stability. *Animal Welfare* 19: 315-323.
- Dalmau A, Rodríguez P, Llonch P and Velarde A (2010b) Stunning pigs with different gas mixtures. Part 2: aversion in pigs. *Animal Welfare* 19: 324-333.
- Darwin CR (1859) *The Origin of Species*. John Murray: London, UK.
- Dawkins MS (2000) Animal minds and animal emotions. *American zoology* 40: 883-888.
- Directiva 74/577/CEE del Consejo, de 18 de noviembre de 1974, relativa al aturrido de los animales antes de su sacrificio.
- Directiva 93/119/CE del Consejo, de 22 de diciembre de 1993, relativa a la protección de los animales en el momento de su sacrificio o matanza.
- Dodman NH (1977) Observations on the use of the Wernburg dip- lift carbon dioxide apparatus for pre-slaughter anaesthesia of pigs. *British Veterinary Journal* 133: 71-80.
- Duncan IJH (1992) Measuring preferences and the strength of preferences. *Poultry Science* 71: 658-663.
- EFSA (2004) Welfare Aspects of Animal Stunning and Killing Methods. Scientific Report of the Scientific Panel for Animal Health and Welfare on a Request from the Commission. Question. Adopted on the 15th of June 2004, Brussels, Belgium.  
[http://www.efsa.eu.int/science/ahaw/ahaw\\_opinions/495/opinion\\_ahaw\\_02\\_ej45\\_stunning\\_report\\_v2\\_en1.pdf](http://www.efsa.eu.int/science/ahaw/ahaw_opinions/495/opinion_ahaw_02_ej45_stunning_report_v2_en1.pdf). Accessed March 14th 2012.
- Eicholz FH (1805) *Aufklärung un Humanität*, Mannheim.
- Eisle JH, Eger EI and Muallem M (1967) Narcotic properties of carbon dioxide in the dog. *Anaesthesiology* 28: 856-865.
- Ernsting J (1963) The effect of brief profound hypoxia upon the arterial and venous oxygen tensions in man. *Journal of Physiology* 169: 292.
- Ernsting J (1965) The effect of anoxia on the central nervous system. In: Gillies JA (Ed.) *A Text Book of Aviation Physiology*. Pergamon Press: pp. 271-289.

- European Comission (2007) Attitudes of EU citizens towards Animal Welfare. Special Eurobarometer 270 Opinion & Social pp 1-82.
- Faucitano L (2010) Effects of lairage and slaughter conditions on animal welfare and pork quality. *Canadian Journal of Animal Science* 90: 461-469.
- Ferrater Mora J (1981) Ética aplicada. Del aborto a la violencia. Alianza: Madrid, España.
- Forslid A (1992) Muscle spasms during pre-slaughter CO<sub>2</sub>-anaesthesia in pigs. Ethical considerations. *Fleischwirtschaft* 72: 167-168.
- Forslid A (1982) Workshop on stunning of livestock. In: Proceedings of 34<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology. Aug. 29–Sept. 2, Brisbane.
- Forslid A (1987) Transient neocortical, hippocampal and amygdaloid EEG silence induced by one-minute inhalation of high concentration carbon dioxide in swine. *Acta Physiologica Scandinavica* 130: 1-10.
- Fraser AF and Broom DM (1990) Farm Animal Behaviour and Welfare. Saunders: New York, USA.
- Fraser D and Matthews LR (1997) Preference and motivation testing. In: Appleby MC, Hughes BO (Eds.) Animal Welfare. CAB International: Wallingford, UK.
- Gannong WF (1996) Regulación de la respiración. En: Fisiología Médica. 15<sup>a</sup> edición. Manual Moderno: Mexico DF, Mexico
- Gerritzen MA, Kluivers-Poodt M, Reimert HGM, Hindle V and Lambooij E (2008) Castration of piglets under CO<sub>2</sub>-gas anaesthesia. *Animal* 2: 1666-1673.
- Gilbert KV, Devine CE, Hand R, Ellery S (1984) Electrical stunning and stillness of lambs. *Meat Science* 11: 45-58.
- Gispert M, Faucitano L, Oliver MA, Guardia MD, Coll C, Siggens K, Harvey K and Diestre A (2000) A survey of pre-slaughter conditions, halothane gene frequency, and carcass and meat quality in five Spanish pig commercial abattoirs. *Meat Science* 55: 97-106.
- Grandin T (2009) Temple Grandin's Webpage, <http://www.grandin.com>, accessed March 14, 2012.

- Grandin T (1985) Cardiac arrest stunning of livestock and poultry. In: Fox MW and Mickley LD (Eds.) *Advances in animal welfare science*. Martinus Nijho Publishers: Boston, USA.
- Gregory NG (1994) Preslaughter handling, stunning and slaughter. *Meat Science* 36: 45-56.
- Gregory NG (2004) Respiratory system. In: *Physiology and behaviour of animal suffering UFAW Animal Welfare Series*. Blackwell Publishing: Oxford, UK.
- Gregory NG (1993) Euthanasia: The assessment of welfare and scientific aspects. In: *Proceedings of the World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences*. Baltimore, USA.
- Gregory NG, Raj ABM, Audsley ARS and Daly CC (1990) Effects of carbon dioxide on man. In: *The use of carbon dioxide for the stunning of slaughter pigs. Report of a meeting of experts held in Heeze from the 26-27th January 1990. Flieschwirtschaft* 70: 1173-1174.
- Gregory NG (1998) Physiology of stress, distress, stunning and slaughter. In *Animal welfare and meat quality*. CAB International: Willingford, UK.
- Guedel AE (1920) Third stage ether anaesthesia. *American Journal of Surgery* 53-57.
- Guerit MJ (1999) Medical technology assessment: EEG and evoked potentials in the intensive care unit. *Clinical Neurophysiology* 29: 301-317.
- Guyton A y Hall JE (1996) Energia y metabolism. In: *Tratado de fisiología médica (novena Edición)*. MacGraw Hill Interamericana: Madrid, España.
- Hall LW (2001) Chapter 2: Patient monitoring and clinical measurement. In: *Veterinary Anaesthesia (third edition)*. Hall LW, Clarke KW and Trim CM (Eds.) W B Saunders, Philadelphia, USA.
- Hargreaves AL and Hutson GD (1990) The effect of gentling on heart rate, flight distance and aversion of sheep to a handling procedure. *Applied Animal Behaviour Science* 26: 243-252.
- Harrison R (1964) *Animal Machines - The New Factory Farming Industry*. Vincent Stuart Publishers Ltd.: London, UK.
- Hill BA and Ray DE (1977) Inert gas narcosis. *Pharmacology and Therapeutics* 3: 99-111.

- Hoenderken R (1983) Electrical and carbon dioxide stunning of pigs for slaughter. In Eikelenboom G (Ed.) *Stunning of Animals for Slaughter*. Martinus Nijhoff: Boston, USA.
- Hoenderken R (1978) *Elektrische bedwelming van slachtvarkens (Electrical stunning of slaughter pigs)*. Doctoral Dissertation, University of Utrecht, The Netherlands.
- Holst S (2001) Carbon dioxide stunning of pigs for slaughter – practical guidelines for good animal welfare. In: *Proceedings of the 47th International Congress of Meat Science and Technology*, Krakow, Poland.
- Holst S (2002) Behaviour in pigs immersed into atmospheric air or different carbon dioxide concentrations. Danish Meat Research Institute. Internal report Ref.no. 02.709 7295. Unpublished data.
- Hughes BO and Duncan IJH (1988) The notion of ethological ‘need’, models of motivation and animal welfare. *Animal Behaviour* 36: 1696–1707.
- Humane Slaughter Association, 1998. Captive Bolt Stunning of livestock, Guidance notes No. 2 2<sup>nd</sup> edition. Available on: [www.hsa.org.uk](http://www.hsa.org.uk). Accessed 14 March 2012.
- Jensen EW (1999) Monitoring depth of anaesthesia by auditory evoked potentials. PhD Thesis, Faculty of Health Sciences, University of Southern Denmark, Odense, Denmark.
- Jensen EW, Lindholm P and Henneberg SW (1996) Autoregressive modelling with exogenous input of middle-latency auditory-evoked potentials to measure rapid changes in depth of anaesthesia. *Methods of Information in Medicine* 35: 256-260.
- Jensen EW, Marianne N and Oteen WH (1998) On-line analysis of middle latency auditory evoked potentials (MLAEP) for monitoring depth of anaesthesia in laboratory rats. *Medical Engineering & Physics* 20: 722-728.
- Jones JB, Wathes CM and Webster AJF (1998) Operant responses of pigs to atmospheric ammonia. *Applied Animal Behaviour Science* 58: 35-47.
- Jongman EC, Barnett JL and Hemsworth PH (2000) The aversiveness of carbon dioxide stunning in pigs and a comparison of the CO<sub>2</sub> stunner crate vs the V-restrainer. *Applied Animal Behaviour Science* 67: 67-76.

- 
- Kant I (1785) *Grundlegung zur Metaphysik der Sitten*. Akademie-Ausgabe, Bd. II, Georg Reimer, Berlin.
  - Kastenschmidt LL, Kastenschmidt J and Helmreich E (1968) Subunit interactions and their relation to the allosteric properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b. *Biochemistry* 7: 3590–3608.
  - Kavaliers M (1989) Evolutionary aspects of the neuro-modulation of nociceptive behaviors. *American Zoology* 29: 1345-1353.
  - Kennedy RR, Stokes JW and Downing P (1992) Anaesthesia and inert gases with special reference to xenon. *Anaesthesia and Intensive Care* 20: 66-70.
  - Kettlewell PJ (1986) Engineering aspects of humane killing of poultry. In: Contract Report (no. CR/173/86/8333) of the National Institute of Agricultural Engineering, Wrest Park, Bedford, UK.
  - Kirkden RD and Pajor E (2006) Using preference, motivation and aversion tests to ask scientific questions about animals' feelings. *Applied Animal Behaviour Science* 100: 29-47.
  - Kirkden RD, Niel L, Lee G, Makowska IJ, Pfaffinger MJ and Weary DM (2008) The validity of using an approach-avoidance test to measure the strength of aversion to carbon dioxide in rats. *Applied Animal Behaviour Science* 114: 216-234.
  - Lang PJ, Bradley MM and Cuthbert BN (1990) Emotion, attention, and the startle reflex. *Psychology Reviews* 97: 377-395.
  - Libell M (2005) A mirror of myself? Monist and dualist views of animals. In: *Animal Bioethics, principles and teaching methods*. Marie M, Edwards S, Gandini G, Reiss M and von Borell (Eds.). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
  - Lind NM, Moustgaard A, Jelsing J, Vajta G, Cumming P and Hansen AK (2007) The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neuroscience Biobehaviour Reviews* 31.
  - Litvan H, Jensen EW, Revuelta M, Henneberg SW, Paniagua P, Campos JM, Martínez P, Caminal P and Villar Landeira JM (2002) Comparison of Auditory Evoked Potentials and the A-line ARX index for monitoring the hypnotic level during sevoflurane and propofol induction. *Acta Anaesthetica Scandinavica* 46: 245-252.

- Manteca X, Gasa J y Velarde A (2008) Bienestar en el ganado porcino. Boehringer Ingelheim: Ingelheim, Alemania.
- Marie M, Edwards S, Gandini G, Reiss M and von Borell E (2005) Animal Bioethics. Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands.
- Martin P and Bateson PPG (1986) Measuring Behaviour (2<sup>nd</sup> edition). Cambridge University Press, Cambridge, USA.
- Martín-Cancho MF, Lima JR, Luis L, Crisóstomo V, López MA, Ezquerra LJ, Carrasco-Jiménez MS and Usón-Gargallo JS (2006) Bispectral index, spectral edge frequency 95% and median frequency recorded at varying desflurane concentrations in pigs. *Research in Veterinary Science* 81: 373-381.
- Martoft L, Lomholt L, Kolthoff C, Rodríguez BE, Jensen EW, Jorgensen PF, Pedersen HD and Forslid A (2002) Effects of CO2 anaesthesia on central nervous system activity in swine. *Laboratory Animals* 36: 115-126.
- Martoft L, Stødkilde-Jørgensen H, Forslid A, Pedersen H, and Jørgensen P (2003) CO2 induced acute respiratory acidosis and brain tissue intracellular pH: A 31PNMR study in swine. *Laboratory Animals* 37: 241-248.
- Masterson FA and Crawford M (1982) The defense motivation system: a theory of avoidance behavior. *Behaviour Brain Science* 5: 661-696.
- Meldrum BS (1994) The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 44: 14-23.
- Mendl M and Paul ES (2004) Consciousness, Emotion and Animal Welfare: Insights From Cognitive Science. *Animal Welfare* 13: 17-25.
- Mendl M, Burman OHP, Parker RMA and Paul ES (2009) Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. *Applied Animal Behaviour Science* 118: 161-181.
- Midgley M (1983) Animals And Why They Matter: A Journey Around the Species Barrier. University of Georgia Press, Athens, Georgia, USA.
- Mischler SA, Alexander M, Battles AH, Raucci JA, Nalwalk JW and Hough LB (1994) Prolonged antinociception followed carbon dioxide anaesthesia in the laboratory rat. *Brain Research* 640: 322-327.
- Mischler SA, Hough LB and Battles AH (1996) Characteristics of Carbon Dioxide Induced antinociception. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 53: 205-212.



- Monin G (1988) Stress d'abattage et qualités de la viande. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 164: 835-842.
- Monin G, Mejenes-Quijano A, Talmant A and Sellier P (1987) Influence of breed and muscle metabolic type on muscle glycolytic potential and meat pH in pigs. *Meat Science* 20: 149-58.
- Mosterín J y Riechmann J (1995) Animales y ciudadanos. Indagación sobre el lugar de los animales en la moral y el derecho de las sociedades industrializadas. Talasa: Madrid, España.
- Muir WW (2007) Chapter 2: Considerations for general anaesthesia. In: Lumb and Jones Veterinary Anaesthesia and Analgesia (Fourth edition). Tranquilli WJ, Thurmon JC and Grimm KA (Eds.) Blackwell Publishing, Malden, USA.
- Munch O (Ed.) 1998 Tiere und Menschen. Geschichte und Aktualität eines prekären Verhältnisses. Paderborn, Viena.
- Offer G (1991) Modeling of the formation of pale, soft and exudative meat – effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis. *Meat Science* 30: 157–184.
- Offer G and Cousins T (2002) The mechanism of drip production – formation of 2 compartments of extracellular-space in muscle postmortem. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58: 107-116.
- Offer G and Knight P (1988) The structural basis of waterholding in meat. In: Developments in Meat Science 4. Lawrie RA (Ed.). Elsevier Applied Science, London, UK.
- Oficina Internacional de Epizootias (OIE) 2009 Terrestrial animal health code, chapter 7.1, article 7.1.1 [http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en\\_chapitre\\_1.7.1.htm](http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.7.1.htm). Accessed online March 14 2012
- Oliver MA, Gispert M and Diestre A (1993) The effects of breed and halothane sensitivity on pig meat quality. *Meat Science* 35: 105-118.
- Pajor EA, Rushen J and de Passille' AM (2000) Aversion learning techniques to evaluate dairy cattle handling practices. *Applied Animal Behaviour Science* 69: 89-102.
- Panella-Riera N, Dalmau A, Fàbrega E, Font i Furnols M, Gispert M, Tibau J, Soler J, Velarde A, Oliver MA and Gil M (2008) Effect of supplementation with

- MgCO<sub>3</sub> and L-Tryptophan on the welfare and on the carcass and meat quality of two halothane pig genotypes (NN and nn). *Livestock Science* 115: 107-117.
- Paul ES, Harding EJ and Mendl M (2009) Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neuroscience Biobehavioural Review* 29: 469-491.
  - Petherick JC, Sutherland RH, Waddington D and Rutter SM (1992) Measuring the motivation of domestic fowl in response to a positive and a negative reinforcer. *Applied Animal Behaviour Science* 33: 357-366.
  - Prändl O, Fischer A, Schmidhofer T and Sinell HJ (1994). Tecnología e higiene de la carne. Acribia: Zaragoza, España
  - Price EO (1984) Behavioral aspects of animal domestication. *Quarterly Review of Biology* 59: 1-32.
  - Raj ABM (2004) Stunning - CO<sub>2</sub> and other gases. In: Devine C and Dikeman M (Eds.) *Enciclopedia of Meat Science*. Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands.
  - Raj ABM (2008) Welfare of pigs during stunning and slaughter. In: *Welfare of pigs from birth to slaughter*. Faucitano, L and Schaefer, AL (Eds.) Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands.
  - Raj ABM (1999) Behaviour of pigs exposed to mixtures of gases and the time required to stun and kill them: welfare implications. *Veterinary Record* 144: 165-168.
  - Raj ABM and Gregory NG (1995) Welfare implications of the gas stunning of pigs 1. Determination of aversion to the initial inhalation of carbon dioxide or argon. *Animal Welfare* 4: 273-280.
  - Raj ABM and Gregory NG (1996) Welfare implications of the gas stunning of pigs 2. Stress of induction of anaesthesia. *Animal Welfare* 5: 71-78.
  - Raj ABM and Johnson SP (1997) Effect of the method of killing, interval between killing and neck cutting and blood vessels cut on the blood loss in broilers. *British Poultry Science* 38: 190-194.
  - Reglamento (CE) N o 1099/2009 DEL CONSEJO de 24 de septiembre de 2009 relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza.
  - Revuelta M, Paniagua P, Campos JM, Fernández JA, Martínez A, Jospin M and Litvan H (2008) Validation of the index of consciousness during sevoflurane

- and remifentanil anaesthesia: a comparison with the bispectral index and the cerebral state index. *British Journal of Anaesthesia* 101: 653-658.
- Ribeiro LM, Ferreira DA, Brás S, Castro A, Nunes CA, Amorim P and Antunes LM (2009) Correlation between clinical signs of depth of anaesthesia and cerebral state index responses in dogs during induction of anaesthesia with propofol. *Research in Veterinary Science* 87: 287-291.
  - Ring C, Erhardt W, Kraft H, Schmidt A, Weinmann HM, Berner H and Unshelm J (1988) Zur Betäubung von Schlachtschweinen mittels carbon dioxide (carbon dioxide anaesthesia for slaughter pigs). *Fleischwirtschaft* 68: 1304-1307 and 1478-1484.
  - Rodriguez P, Dalmau A, Ruiz-de-la-Torre JL, Manteca X, Jensen EW, Rodriguez B, Litvan H and Velarde A (2008) Assessment of unconsciousness during carbon dioxide stunning in pigs. *Animal Welfare* 17: 341-349.
  - Rosenfold K and Andersen HJ (2003) Factors of significance for pork quality - A review. *Meat Science* 64: 219-237.
  - Roughton FJW (1964) Transport of oxygen and carbon dioxide. In: Handbook of physiology. Fenn WO and Rahn H (Eds.). American Physiological Society, Washington, USA.
  - Rushen J (1991) Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 28: 381-386.
  - Rushen J (2003) Changing concepts of farm animal welfare: bridging the gap between applied and basic research. *Applied Animal Behaviour Science* 81: 199-214.
  - Rushen J (1986) The validity of behavioural measures of aversion: a review. *Applied Animal Behaviour Science* 16: 309-323.
  - Rushen J and Congdon P (1987) Electro-immobilisation of sheep may not reduce the aversiveness of a painful treatment. *Veterinary Record* 120: 37-38.
  - Rutter SM and Duncan IJH (1991) Shuttle and one-way avoidance as measures of aversion in the domestic fowl. *Applied Animal Behaviour Science* 30: 117-124.

- Schweitzer A (1923) *Cultural Philosophy II: Civilization and Ethics*. Kulturphilosophie II: Kultur und Ethik. In: Paul Haupt P (Ed.). Bern, Switzerland. Translated by Naish J (1929) A. & C. Black: London, UK.
- Serpell JA and Paul ES (1994) Pets and development of positive attitudes to animals. In: Manning A and Serpell JA (Eds.) *Animals and Human Society: Changing Perspectives*. Routledge: London, UK.
- Shaw NA (2002) The neurophysiology of concussion. *Progress in Neurobiology* 67: 281-344.
- Silva A, Ferreira DA, Venâncio C, Souza AP and Antunes LM (2011). Performance of electroencephalogram-derived parameters in prediction of depth of anaesthesia in a rabbit model. *British Journal of Anaesthesia* 106: 540-547.
- Singer P (1975) *Animal liberation: A new ethics for our treatment of animals*. Jonathan Cape, London, UK.
- Sorabji R (1993) *Animal minds and human morals: The origins of the Western debate*. Ithaca, Cornell University Press, New York, USA.
- Suits DB (2001) Why Death Is Not Bad for the One Who Died. *American Philosophical Quarterly* 38: 69-84.
- Taubald B (2005) Religious resources for animal ethics. In: *Animal Bioethics, principles and teaching methods*. Marie M, Edwards S, Gandini G, Reiss M and von Borell (Eds.). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Terlouw C (2005) Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience. A brief review of recent findings. *Livestock Production Science* 94: 125-135.
- Thornton C, Konieczko KM, Knight AB, Kaul B, Jones JG, Doré CJ and White DC (1989) Effect of propofol on the auditory evoked response and oesophageal contractility. *British Journal Anaesthesia* 63: 411-417.
- Treaty of Amsterdam amending the Treaty of the European Union, the Treaties establishing the European Communities and certain related acts. Signed on 2<sup>nd</sup> October 1997 and entered into force on 1 May 1999.
- Troeger K, Machold U, Moje M and Behrschmidt M (2005) Gas stunning of pigs. A comparison of carbon dioxide, argon, a nitrogen/argon mixture and

- argon/ carbon dioxide under meat quality aspects. 3. Summary and discussion of results; conclusions. *Fleischwirtschaft* 5: 109-111.
- Troeger K, Machold U, Moje M, and Behrschmidt M (2003) Betäubung von Schweinen mit Kohlendioxid, argon, Stickstoff-argon-Gemisch oder argon / Kohlendioxid (2-stufig)-Schlaktkörper- und Fleischqualität. 2. Schlachttechnologie- Workshop 8. Mai 2003, Kulmbach, Germany.
  - Troeger K and Woltersdorf W (1990) Electrical stunning and meat quality in the pig. *Fleischwirtschaft International* 4: 3-10.
  - Troeger K and Woltersdorf W (1991) Gas anaesthesia of slaughter pigs. Stunning experiments under laboratory conditions with fat pigs of known halothane reaction type: meat quality and animal protection. *Fleischwirtschaft* 71: 1063-1068.
  - Van der Wal PG (1987) Chemical and physiological aspects of pig stunning in relation to meat quality-A review. *Meat Science* 2: 19-30.
  - Van der Wal PG (1997) Causes for variation in pork quality. *Meat Science* 46: 319-327.
  - Veasy JS, Waran NK and Young RJ (1996) On comparing the behaviour of zoo housed animals with wild conspecifics as a welfare indicator. *Animal Welfare* 5: 13-24.
  - Velarde A, Cruz J, Gispert M, Carrión D, Ruiz-de-la-Torre JL, Diestre A and Manteca X (2007) Aversion to carbon dioxide stunning in pigs: effect of the carbon dioxide concentration and the halothane genotype. *Animal Welfare* 16: 513-522.
  - Velarde A, Gispert M, Faucitano L, Alonso P, Manteca X and Diestre A (2001) Effects of the stunning procedure and the halothane genotype on meat quality and incidence of haemorrhages in pigs. *Meat Science* 58: 313-319.
  - Velarde A, Gispert M, Faucitano L, Manteca X and Diestre A (2000) The effect of stunning method on the incidence of PSE meat and haemorrhages in pork carcasses. *Meat Science* 55: 309-314.
  - Velarde A, Ruiz-de- la-Torre JL, Roselló C, Fàbrega E, Diestre A and Manteca X (2002) Assessment of return to consciousness after electrical stunning in lambs. *Animal Welfare* 11: 333-341.

- Warriss PD (2000) *Meat Science. An Introductory Text*. CABI Publishing: Oxfordshire, UK.
- Warriss PD and Brown SN (1987) The relationship between initial pH, reflectance and exudation in pig muscle. *Meat Science* 20: 65-74.
- Warriss PD, Brown SN, Adams SJM and Corlett IK (1994) Relationships between subjective and objective assessment of stress at slaughter and meat quality in pigs. *Meat Science* 38: 329-340.
- Whay HR, Main DC, Green LE and Webster AJ (2003) Assessment of the welfare of dairy cattle using animal-based measurements: Direct observations and investigation of farm records. *Veterinary Record* 153: 197-202.
- Wotton SB and O' Callaghan M (2002) Electrical stunning of pigs: the effect of applied voltage on impedance to current flow and the operation of a fail-safe device. *Meat Science* 60: 203-208.
- Wotton SB and Gregory NG (1986) Pig slaughtering procedures: time to loss of brain responsiveness after exsanguination or cardiac arrest. *Research in Veterinary Science* 40: 148-151.
- Wotton SB, Anil MH, Whittington PE and McKinsty JL (1992). Pig slaughter procedures: Head-to-back stunning. *Meat Science* 32: 245-255.
- Yamakura T and Harris RA (2000) Effects of Gaseous Anesthetics Nitrous Oxide and Xenon on Ligand-gated Ion Channels: Comparison with Isoflurane and Ethanol. *Anesthesiology* 93: 1095-1101.
- Zeller W, Schatzmann U and Imhof A (1987) *Die. Fleischwirtschaft* 67: 1519.

**CAPÍTOL 2 / CHAPTER 2**

**Objectius**

---





## OBJECTIUS

1. Avaluar l'aversió dels porcs a les mescles de gas compostes per un 70 % de nitrogen i un 30 % de CO<sub>2</sub> (70N30C), un 80 % de nitrogen i un 20 % de CO<sub>2</sub> (80N20C) i un 85 % de nitrogen i un 15 % de CO<sub>2</sub> (85N15C).
2. Determinar la validesa de l'*Index of Consciousness* (IoC-view®) com a mètode per mesurar la inconsciència en porcs durant l'anestèsia induïda amb Propofol.
3. Mesurar l'activitat cerebral mitjançant l'IoC-view® durant l'exposició a les mescles de gasos compostes per 70N30C, 80N20C i 85N15C i a un 90 % de CO<sub>2</sub> (90C) en porcs i relacionar-ho amb el comportament i els reflexos fisiològics.
4. Avaluar els efectes de l'exposició a les mescles de gasos compostes per 70N30C, 80N20C, 85N15C i a 90C sobre el benestar animal i la qualitat de la canal i de la carn en porcí.



## OBJECTIVES

1. To assess aversion in pigs exposed to the air gas mixtures composed by a 70 % nitrogen and 30 % CO<sub>2</sub> (70N30C), an 80 % nitrogen and 20 % CO<sub>2</sub> (80N20C) and an 85 % nitrogen and 15 % CO<sub>2</sub> (85N15C).
2. To determine the feasibility of the *Index of Consciousness* (IoC-view<sup>®</sup>) as a method to assess unconsciousness during Propofol<sup>®</sup> anaesthesia in pigs.
3. To measure brain activity by means of IoC-view<sup>®</sup> during the exposure to 70N30C, 80N20C, 85N15C and 90C gas mixtures in pigs and to relate brain activity with behaviour and physiological reflexes.
4. To assess the effects on animal welfare and carcass and meat quality of the gas stunning of pigs by using 70N30C, 80N20C, 85N15C and 90C gas mixtures.



**CAPÍTOL 3 / CHAPTER 3**

**Aversion to nitrogen and carbon dioxide mixtures for stunning pigs**

**Chapter based on a paper published in Animal Welfare**

**2012 21: 33-39**

---



**ABSTRACT**

Inhalation of concentrations above 30% of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) by volume in atmospheric air causes aversion in pigs. The objective of this study was to assess, using aversion learning techniques and behavioural studies, the aversion to 3 alternative gas mixtures of nitrogen (N<sub>2</sub>) and CO<sub>2</sub>: 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C). The experiment consisted of two trials of 3 groups of 10 pigs each. Pigs were placed individually at the starting point of the test facility and allowed to enter the crate of a dip-lift stunning system during 1 control session with atmospheric air and 3 treatment sessions with one of the gas treatments in each group. When the pit contained any of the 3 gas mixtures, the time taken to cross the raceway and enter the crate did not increase compared to the control session. However, when exposed to the gas mixtures, the majority (85.80%) of pigs performed retreat attempts in the crate, 22.22% exhibited escape attempts, and 7.91% vocalized, without differences among gas mixtures. The percentage of pigs showing gasping was higher when exposed to 70N30C than 80N20C and 85N15C. The results suggest that pigs show signs of aversion to the inhalation of 15 to 30% CO<sub>2</sub> in nitrogen atmosphere compared to atmospheric air but the aversion response did not increase in consecutive sessions.





## 1 INTRODUCTION

To avoid pain, suffering or stress, animals must be rendered unconscious before being slaughtered (Council Regulation (EC) No 1099/2009). The most commonly used methods for stunning pigs are inhalation of high concentrations of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and electronarcosis. When inhaled at high concentrations, CO<sub>2</sub> induces hypercapnic hypoxia and depresses brain activity until the loss of consciousness (Raj, 1999; Raj & Gregory 1996; Gregory *et al.*, 1987). Carbon dioxide stunning allows the exposure of animals in group, thus reducing human contact during handling and decreasing pre-slaughter stress (Velarde *et al.*, 2000). This, together with the lower intensity of muscular contractions compared to electrical stunning, reduces the incidence of PSE meat and haemorrhages (Velarde *et al.*, 2000) and improves meat quality.

Concerning animal welfare, the inhalation of CO<sub>2</sub> has been criticized due to its aversive effects before the loss of consciousness, which is not immediate (Raj *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 2008). Aversion could be due to the inhalation of the gas or to the descending movement itself (Hartung *et al.*, 2002). Previous studies have shown that either isolation of an animal and caging (Raj & Gregory 1996), or the vertical movement of a crate descending into atmospheric air (EFSA, 2004) induces fear in pigs. However, this aversive reaction to the descending movement of the stunning box decreases when pigs are exposed repeatedly to this situation (Velarde *et al.*, 2007; Dalmau *et al.*, 2010b). In humans, the inhalation of high concentrations of CO<sub>2</sub> causes irritation of the respiratory tract and a sense of breathlessness (Gregory *et al.*, 1990). Raj and Gregory (1995) assessed aversion from the pigs' reluctance to enter into different gaseous atmospheres to obtain a reward (apples), and concluded that an atmosphere containing a 90% CO<sub>2</sub> was aversive to the majority of pigs. CO<sub>2</sub>-sensitive chemoreceptors are distributed along the respiratory tract (Manning & Schwartzstein, 1995) and their activation in the upper tract causes anxiety and pain in pigs (Troeger & Waltersdorf, 1991). Velarde *et al.* (2007) suggested that the higher the CO<sub>2</sub> concentration, the more pronounced the aversion. Additionally, CO<sub>2</sub> induces severe respiratory distress causing hyperventilation associated with gasping (Gregory *et al.*, 1990). Gasping is a rudimentary respiratory activity occurring through mouth that is indicative of sense of breathlessness (EFSA, 2004). Some results indicate that when pigs perceive the gas,

signs of aversion such as backing away, head shaking and escape attempts are observed (Raj & Gregory, 1996).

In contrast to hypercapnia, hypoxia (less than 2% O<sub>2</sub> by volume in atmospheric air) induced by the inhalation of an atmosphere with inert gases, such as argon (Ar) or nitrogen (N<sub>2</sub>), that displaces oxygen, is reported to be non aversive (Ernsting, 1963, 1965; Raj *et al.*, 1997; Raj, 1999). Research has shown that argon-induced hypoxia does not induce aversion or any signs of respiratory distress prior to loss of consciousness (Raj & Gregory, 1995). However, argon has a low presence in the atmosphere (0.9%) and its availability for commercial stunning practices might be limited (Dalmau *et al.*, 2010a). In contrast, nitrogen is the main component of the atmospheric air and its availability is higher than that of other inert gases. However, the time to lose consciousness when exposed to hypoxia (54s) is longer than when animals are exposed to hypercapnia (>80% CO<sub>2</sub>) (32s) (Raj *et al.*, 1997). Gregory (1995) reported that the addition of CO<sub>2</sub> to a hypoxic atmosphere reduces the time needed to induce unconsciousness. However, according to Raj and Gregory (1995), the CO<sub>2</sub> concentration of the gas mixture should be up to 30% in the atmosphere in order to avoid aversion.

The relative density of nitrogen (0.97) is slightly lower than that of air (1.00) and its stability, defined as the capability of the gas to be sustained within the pit without being displaced by oxygen, is uncertain (Dalmau *et al.*, 2010a). Nevertheless, this stability could be improved combining nitrogen with CO<sub>2</sub>. Hence, the higher the concentration of nitrogen in a gas mixture with CO<sub>2</sub>, the lower the relative density of the mixture and, therefore, more difficult it is to displace the oxygen from the pit. In addition, gas mixtures of N<sub>2</sub> and up to 30% CO<sub>2</sub> have high stability and uniform concentrations along the pit (Dalmau *et al.*, 2010a).

Aversion learning techniques are based on behaviour assessment, and have been used to objectively determine the degree of aversion that animals experience during short-lasting events. Rushen (1996) proposed that these techniques may be useful in predicting the extent of some of the physiological responses to stressors, which suggests that the aversion that an animal feels in response to a treatment is a factor in determining the magnitude of the physiological response. Raj and Gregory (1995) stated that when pigs are exposed to an unpleasant situation, such as exposure to high concentrations of CO<sub>2</sub>, avoidance behaviour could be taken as a sign of aversion.

The objective of this study was to assess the aversion of slaughter pigs to the inhalation of 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C) with less than 2% of O<sub>2</sub> by volume in atmospheric air.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Animals

Sixty halothane-free female pigs of 93.1±1.91 kg live weight were used in the experiment. Pigs came from a commercial farm in two separate batches of thirty animals and arrived at the IRTA facilities 3 days before the start of the trial. Upon arrival, each batch was divided into three groups of ten animals, and each group was housed in a pen of 18.3 m<sup>2</sup> (8.3x2.2 m). Pigs were fed *ad libitum* with the same diet that they had received on the farm of origin, and water was also available *ad libitum*.

### 2.2 Facilities

The experiment was carried out in the experimental slaughterhouse of IRTA, which is equipped with a Dip Lift stunning unit (Butina, Alps, Copenhagen). This system consists of a crate of 195 cm length, 90 cm high and 61 cm wide that has a perforated floor to facilitate gas distribution. The crate has a guillotine entrance door and an exit ramp gate at the opposite end, both with a non-slip steel ramp of 7° to facilitate the entrance and the exit of the animals. The crate descends into a well 260 cm depth and of 8 m<sup>3</sup>. The required gas mixtures were supplied through an inlet valve placed at the bottom of the pit. The N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations were mixed and controlled with two flowmeters (Dalmau *et al.*, 2010a,b) that worked at three bars of pressure and a flow rate of 16 Nm<sup>3</sup>/hour. Before each animal exposure, the CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations were monitored at 120 cm depth with a portable infrared and electrochemical sensor, respectively (Map Check Combi O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, PBI-Dansensor, Spain), and prefilled until the desired concentrations. The building containing the housing pens was adjacent to the slaughterhouse and it was connected to the stunning unit by a corridor of 412 cm length and 60 cm wide. The walls of the corridor were stainless steel panels of 90 cm height which prevented pigs from seeing over the top and turning around.

### 2.3 Experimental procedure

The experiment consisted of two similar trials with three groups of 10 animals each. Each trial included 4 sessions: 1 control session and 3 treatment sessions. The sessions were carried out daily with an average interval of 24h in order to give time to recover between gas exposures, during the treatment sessions. A good recovering was assessed before the exposure by means of alimentary, exploratory and resting behaviour in the pen. If any pig showed signs of being not recovered, the animal was removed from the experiment. Previously to the treatment sessions, animals were trained during 4 consecutive days to familiarize them with the stunning facilities and reduce the effect of novelty until 2 days before the control session. In the first two training sessions, pigs were moved through the corridor and the stunning crate, which remained stationary to allow the animal moving through freely. After leaving the crate, pigs were taken back to the housing pen. During the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> training sessions, after entering the crate, the animals were descended into the pit with atmospheric air. The control session was taken as a reference for the pigs' behaviour in atmospheric air to be compared later with the gas mixture treatments. During treatment sessions the first group was exposed to a gas mixture containing 70N30C; the second group was exposed to a gas mixture containing 80N20C, and the third group was exposed to a mixture of 85N15C. In each group, the well contained one of the 3 gas mixtures during all treatment sessions.

During control and treatment sessions, pigs were taken individually, in a random order within the group, to the start of the corridor and allowed to cross it for ten minutes until they entered the crate. If, after that time, an animal had not entered the crate, a person placed behind prevented it from coming back. Five minutes later, if the pig was still reluctant to enter into the crate, it was gently pushed inside and the guillotine door was closed. When the animal entered the crate, the exit gate was closed and the pig descended into the well. During the training, control and treatment sessions, pigs descended into the well with atmospheric air for 15s until they reached a depth of 120 cm, remained stationary for 5 s and ascended for 15 s. The total cycle time was 35 s. Once at the top, the exit gate was opened and the pig returned to the housing pen. Once the cycle was finished, the animal was allowed to recover and, afterwards, moved to the housing pen. Before the exposure of the following pig, if present, faeces and urine were removed along the corridor and inside crate. After the end of each group treatment

sessions of each trial all pigs were euthanized by exposure to 90% concentrations of CO<sub>2</sub>.

## 2.4 Measurements

The behaviour of the animal during the training and treatment sessions was recorded by two video cameras, one placed in the area of the corridor and the other inside the crate. Both video cameras were connected to a digital audio-image recorder (VDVR-4S 550430, Circontrol, Spain).

In the corridor, the time taken to enter the crate by each pig was recorded. In addition, handling was scored as “0” if the pig entered the crate voluntarily or “1” if it did not and had to be pushed into the crate. The presence and the onset of the following behaviours in the crate were assessed to determine aversion:

- Retreat attempts: Pigs backing away (Dodman 1977; Dalmau *et al.*, 2010b).
- Escape attempts: Pigs raising their forelegs on the side of the crate either at the time of or prior to lose balance (Raj & Gregory, 1996).
- Vocalizations: shouts or snores emitted by the animal during induction of unconsciousness (EFSA, 2004; Rodríguez *et al.*, 2008). Only the vocalizations emitted before the loss of balance were considered to be a sign of aversion.
- Gasping: A very deep breath through a wide open mouth, which may involve stretching of the neck. It is considered to be an indicator of onset of breathlessness (Velarde *et al.*, 2007).

The presence and duration of muscular excitation, defined as a period of struggling ranging from fairly vigorous running and jumping movements to clonic convulsive seizures (Dodman, 1977), were recorded.

The time to loss of balance, defined by the inability of the animal to remain in a standing position, was considered the first indicator of onset of unconsciousness (Raj & Gregory, 1996). All behaviours in the corridor and in the crate were assessed visually by means of the video recorded whereas vocalisations were assessed by the audio recorded. All recording time were synchronized with the time the crate started to descend into the pit.

## **2.5 Statistical Analysis**

Data were analyzed with the Statistical Analysis System package (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1999-2001). Time to cross the corridor, to show retreat attempts, to show escape attempts, to show gasping, to loss balance, to show vocalizations and the onset of muscular excitation phase as well as its duration, were analysed using a mixed model analysis of variance (PROC MIXED) with a covariance structure of compounds symmetric (CS) using “trial”, “gas mixture” and “session” as fixed effects. When differences between trials were significant ( $P < 0.05$ ), each trial was analysed separately. The order of the animal as a random effect and the animals as repeated measures were included in the model. When the analysis of variance showed significant differences ( $p < 0.05$ ), a least square means comparison test (LSMEANS) adjusted to multiple comparison test of Tukey was carried out.

Binary data such as presence of retreat attempts, escape attempts, loss of balance, gasping, vocalizations and muscular excitation were analyzed using a generalized linear model analysis of variance (PROC GENMOD) following a binomial distribution. “Trial”, “session” and “gas mixture” were considered as fixed effects.

During control session, differences among groups were analysed. The behaviour during the treatment sessions was compared with that during the control session. Different correlations (PROC CORR) were analysed between those variables that could have an effect according to the aversion criteria using Pearson correlation's coefficient (parametric data) or Spearman rank coefficient (non-parametric data).

The experiment was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of IRTA.

## **3 RESULTS**

### **3.1 Control session**

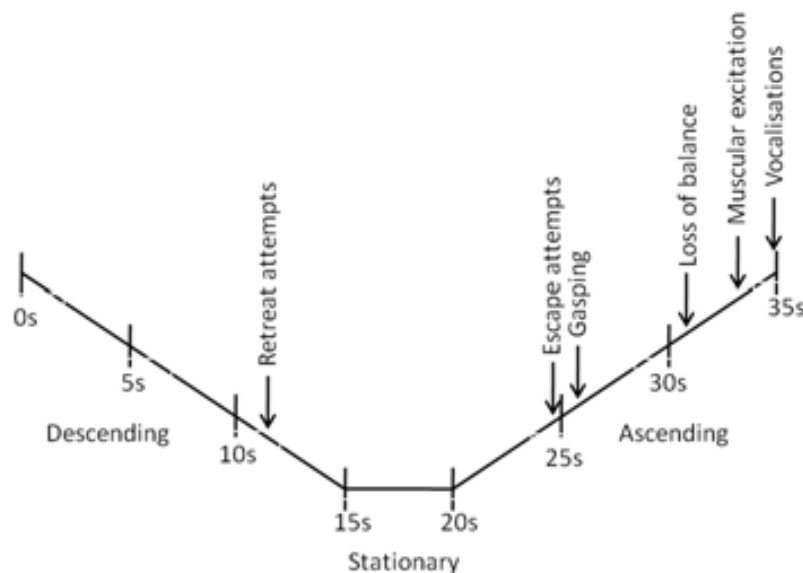
Time to enter the crate ( $249.3 \pm 35.19$ s) and percentage of animals that entered voluntarily ( $84.8 \pm 4.72\%$ ) was not different between trials or groups. During the descent of the crate into the pit, the percentage of animals attempting to retreat ( $67.8 \pm 6.13\%$ ) and attempting to escape ( $5.0 \pm 2.83\%$ ) was not different between trials or groups. In the

control session none of the pigs showed gasping, loss of balance, vocalizations or muscular excitation inside the crate.

### 3.2 Treatment sessions

The time to enter the crate and the percentage of animals that did not enter voluntarily were significantly higher ( $P = 0.0037$ ) in trial 1 ( $388.2 \pm 30.57$ s and 30%, respectively) than in trial 2 ( $223.5 \pm 15$ s and 11%, respectively). Nevertheless, none of these measures increased significantly between control and treatment sessions in any gas mixture.

The percentage of animals that showed signs of aversion in the crate that were significantly different between sessions and treatments is presented in Table 1. The chronological onset of these behaviours in the crate is shown in Figure 1.



**Figure 1. Average time to perform retreat and escape attempts, gasping, loss of balance muscular excitation and vocalisations during gas exposure.**

In all gas mixtures, the percentage of animals that performed retreat attempts during treatment sessions increased compared to control session, being significantly higher in the last treatment session ( $P = 0.0141$ ) (Table 1). The time to show the first retreat attempt was not affected by gas mixture or session in any trial ( $10.8 \pm 0.60$ s). Animals that did not enter the crate voluntarily exhibited fewer retreat attempts than those that entered voluntarily ( $P = 0.0346$ ). In the 3 gas mixtures, the percentage of animals that performed escape attempts during the treatment sessions was higher compared to the

control session ( $P < 0.05$ ). The time to perform the first escape attempt was not different between gas mixtures or session in any trial ( $24.2 \pm 1.40$ s).

**Table 1. Percentages (%) of animals showing retreat attempts, escape attempts, vocalizations, muscular excitation and gasping by treatments 70N30C, 80N20C and 85N15C.**

	Session	70N30C	80N20C	85N15C
Retreat attempts (%)	Control	73.68	60.00	70.00
	4	73.68	85.00	85.00
	5	100	90.00	85.00
	6	84.21	95.00	73.68
Escape attempts (%)	Control	0 <sup>b</sup>	10.00 <sup>b</sup>	5.00 <sup>b</sup>
	4	20.00 <sup>a</sup>	15.00 <sup>a</sup>	15.00 <sup>a</sup>
	5	30.00 <sup>a</sup>	40.00 <sup>a</sup>	20.00 <sup>a</sup>
	6	25.00 <sup>a</sup>	25.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>
Vocalizations (%)	Control	-	-	-
	4	31.57	35.00	40.00
	5	42.10	50.00	40.00
	6	42.10	35.00	30.00
Muscular excitation (%)	Control	-	-	-
	4	26.31 <sup>x</sup>	5.00 <sup>y</sup>	20.00 <sup>x</sup>
	5	35.29 <sup>x</sup>	5.00 <sup>y</sup>	30.00 <sup>x</sup>
	6	36.84 <sup>x</sup>	15 <sup>y</sup>	25 <sup>x</sup>
Gasping (%)	Control	-	-	-
	4	57.89 <sup>x</sup>	35.00 <sup>y</sup>	15.00 <sup>y</sup>
	5	78.95 <sup>x</sup>	30.00 <sup>y</sup>	50.00 <sup>y</sup>
	6	78.94 <sup>x</sup>	55.00 <sup>y</sup>	40.00 <sup>y</sup>
Loss of balance (%)	Control	-	-	-
	4	52.63	65	55
	5	68.42	65	55
	6	73.68	80	65

Means with different a,b,c letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) among session and with different x,y,z letters are different among treatments.



Vocalizations, muscular excitation, gasping and loss of balance appeared only during treatment sessions. The prevalence of gasping was significantly ( $P < 0.001$ ) higher in 70N30C than 80N20C and 85N15C (71.93% vs. 40.00% and 35.00% respectively) and no differences were found in the time to perform it between gas mixtures and sessions ( $25.7 \pm 0.72$ s). On average, a 7.91% of pigs vocalised before the loss of balance at  $30.2 \pm 2.71$ s after the beginning of the exposure, without differences among gas mixtures and sessions. The percentage of animals that performed muscular excitation was significantly lower when exposed to 80N20C (8.33%) than when exposed to 70N30C (32.73%,  $P = 0.002$ ) and 85N15C (25.00%,  $P = 0.0186$ ). The time to onset the muscular excitation ( $34.9 \pm 0.72$ s) and its duration ( $8.9 \pm 0.82$ s) were not affected by the gas mixtures or sessions in any trial.

The percentage of animals that lost balance (64.41%) was not affected by gas mixtures or sessions, but was significantly higher in pigs that had been pushed into the crate compared to those that entered voluntarily (100% vs. 63.24% respectively;  $P < 0.001$ ). In the second trial, pigs exposed to 85N15C lost balance earlier than those exposed to 80N20C ( $29.2 \pm 0.61$  vs.  $32.2 \pm 0.43$  respectively,  $P = 0.0089$ ).

#### 4 DISCUSSION

Velarde *et al.* (2007) and Dalmau *et al.* (2010b), using the same facilities that were used in this study, determined that pigs became habituated after being repeatedly exposed to the process of entering the crate and descending into a pit with atmospheric air. When the control session started, pigs were already habituated to the test facilities and the movement of the crate through the pit. Hence, it was decided to follow the same experimental design as Velarde *et al.* (2007) and to establish the control session after two training sessions, in order to compare air and treatment gas mixtures.

Velarde *et al.* (2007) stated that increased time to enter the crate when pigs are exposed to an unpleasant situation on consecutive sessions indicates aversion. Actually, animals can learn to predict from certain stimulus, such as crossing the corridor that leads to the gas exposure, and if it is negative, the animals show aversion to the stimulus. The magnitude of these responses can be measured objectively by measuring the time to enter and this can be used to infer the extent of aversion (Rushen, 1986). According to our results, the time to enter the crate and the percentage of animals that did not enter

the crate voluntarily did not increase significantly between control and treatment sessions. Hence, in accordance to the magnitude of the aversive response, the exposure to nitrogen and CO<sub>2</sub> mixtures was not unpleasant enough for animals trying to avoid it in subsequent sessions. Dalmau *et al.* (2010b) found that pigs that had shown muscular excitation during gas exposure in previous sessions increased significantly the aversive response in subsequent exposures. They concluded that the muscular excitation suffered by some animals during the gas exposure causes traumatism and pain which, by association, leads to an increased time to enter the crate in the following sessions. According to our results, pigs exposed to 70N30C and 85N15C showed a higher incidence of muscular excitation than pigs exposed to 80N20C. However, the reluctance to enter the crate in subsequent sessions was not different between treatments. In contrast to Dalmau *et al.* (2010b), we never found traumatisms or signs of pain during treatment sessions, and they used longer times of exposure to the gas treatment and during more sessions than in the present study. It has also been stated that an increase in CO<sub>2</sub> concentration stimulates the aversion to the gas mixture because of an early detection of the gas at the entrance of the crate (Velarde *et al.*, 2007). Our results suggest that between 15 to 30% CO<sub>2</sub> pigs are not able to distinguish differences in CO<sub>2</sub> concentrations before entering the crate.

Dodman (1977) and Raj and Gregory (1996) considered both retreat and escape attempts as signs of aversion. Although those behaviours were also present during the control session, the percentage of animals showing retreat and escape attempts was higher in the treatment sessions compared to the control session, suggesting that the exposure to any of the gas mixtures of the study could be more aversive for pigs than the exposure to atmospheric air. In fact, the appearance of gasping and vocalisations in some animals before the loss of balance during the treatment sessions confirms that exposure to nitrogen mixed with 15% to 30% of CO<sub>2</sub> is aversive compared to atmospheric air, as suggested by Dalmau *et al.* (2010b). Concerning the high concentrations of CO<sub>2</sub>, Dalmau *et al.* (2010b) compared the time to retreat between pigs exposed to hypercapnic anoxia (70N30C and 85N15C) with the results obtained by Velarde *et al.* (2007) in pigs exposed to 90% CO<sub>2</sub> (90C) and 70% CO<sub>2</sub> (70C) in the same facilities and concluded that the first retreat attempt appeared earlier in animals exposed to 90C and 70C than in animals exposed to 70N30C or 85N15C. The time to retreat in our experiment confirms these findings since it was not different among gases

(11.4±0.69s), and the first retreat attempt appeared later than in animals exposed to 70C and 90C. In conclusion, our results show that aversion to CO<sub>2</sub> gas mixtures is higher than to atmospheric air but lower than to high concentrations of CO<sub>2</sub>.

Raj (1999) suggested that vocalisations after losing balance could occur while the animals were unconscious and consequently could not be taken as signs of aversion. In this study 8% of pigs exposed to nitrogen and CO<sub>2</sub> mixtures vocalised before the loss of balance. The fact that this measure was not present during control session and appeared during treatment sessions suggests that at least 8% of the pigs felt the inhalation of the gas mixtures aversive. A more accurate determination of the state of awareness before and after the loss of balance is needed to confirm if vocalisations after the loss of balance are signs of aversion.

According to the prevalence and the onset of retreat attempts, escape attempts and vocalisations, the aversive response to the inhalation was similar regardless of the gas mixture. These results are in agreement with Dalmau *et al.* (2010b), who compared different nitrogen and CO<sub>2</sub> mixtures with high concentrations of argon, and concluded that aversion only decreased significantly using high concentrations of argon without CO<sub>2</sub> in the atmosphere. The incidence of gasping was higher in animals exposed to 70N30C than in animals exposed to 80N20C and 85N15C. Although gasping is not an expression of aversion, it is a rudimentary respiratory activity occurring through the mouth, and it is considered a physiological reaction associated with breathlessness during the inhalation of CO<sub>2</sub> (Raj & Gregory, 1996). Raj and Gregory (1996) stated that inhalation of more than 30% of CO<sub>2</sub> induces severe respiratory distress. According to our results, this also applies to mixtures with around 30% CO<sub>2</sub> but become significantly lower at concentrations around 20%.

Loss of balance is considered the first indicator of onset of unconsciousness (Raj & Gregory, 1996). The proportion of animals that lost balance was similar between gas mixtures. Nevertheless, the time to lose balance was shorter in the gas mixture with a lowest CO<sub>2</sub> concentration (85N15C) than in 80N20C during the second trial. In contrast, Dalmau *et al.* (2010b) and Raj *et al.* (1997) suggested that the higher the CO<sub>2</sub> concentration, the shorter the time to lose balance, and consequently, consciousness. In our experiment, this difference appeared only in the second trial, which make this result not reliable. In fact, during this trial only 53% of the animals exposed to 85N15C lost

balance compared to 83% of the animals exposed to 80N20C and it is therefore difficult to draw conclusions. On the other hand, an effect of handling to enter the crate was found since pigs that were pushed into the crate lost balance earlier than those that entered voluntarily. Actually, Broom (2000) reported that a higher excitability in pigs could produce an increase in the respiratory frequency with faster and deeper respirations, which facilitates the uptake of CO<sub>2</sub> and shortens the induction of unconsciousness (Forslid, 1992). Hence, as previously mentioned by Dalmau *et al.* (2010b) and Velarde *et al.* (2007), a higher excitation of the animals that entered reluctantly to the crate may modify the effect of the gas mixtures on the animal.

## 5 CONCLUSIONS

Taking into account the time to enter the crate and the percentage of animals entering voluntarily, it is concluded that exposure to nitrogen and carbon dioxide mixtures does not represent a negative stimulus that animals try to avoid in consecutive sessions. Based on the percentage of animals showing retreat and escape attempts, gasping and vocalizations before the loss of balance, it can be concluded that the exposure to 70N30C, 80N20C and 85N15C is more aversive than the exposure to atmospheric air. Pigs show a similar aversion to the three gas mixtures although a higher CO<sub>2</sub> concentration in the atmosphere causes an increase of the sense of breathlessness. Pigs exposed to 80N20C show less muscular excitation during exposure to the gas.

## 6 ACKNOWLEDGMENTS

This work was founded by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (AGL2005 – 06671 – CO2 – 01). Thanks are due to Mr. Albert Brun, Mr. Albert Herce and Mr. Agustí Quintana for their help during the study.

## 7 REFERENCES

- Broom D M (2000) Welfare assessment and welfare problems areas during handling and transport. In: Livestock Handling and Transport. Grandin T (ed). CABI Publishing: New York, USA.

- 
- Dalmau A, Llonch P, Rodríguez P, Ruíz-de-la-Torre JL, Manteca X and Velarde A (2010a) Stunning pigs with different gas mixtures. Part 1: gas stability. *Animal Welfare*, 19: 315-323.
  - Dalmau A, Rodríguez P, Llonch P and Velarde A (2010b) Stunning pigs with different gas mixtures. Part 2: aversion in pigs. *Animal Welfare*, 19: 324-333.
  - Dodman NH (1977) Observations on the use of the Wernburg dip-lift carbon dioxide apparatus for pre-slaughter anaesthesia of pigs. *British Veterinary Journal*, 133: 71-80.
  - Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the protection of animals at the time of killing. *European Community Official Journal*, L303: 1-30.
  - EFSA (2004) Welfare aspects of animal stunning and killing methods. Scientific report of the Scientific Panel for Animal Health and Welfare on a request from the Commission. Question. Adopted on the 15th of June 2004. Brussels [http://www.efsa.eu.int/science/ahaw/ahaw\\_opinions/495/opinion\\_ahaw\\_02\\_ej45\\_stunning\\_report\\_v2\\_en1.pdf](http://www.efsa.eu.int/science/ahaw/ahaw_opinions/495/opinion_ahaw_02_ej45_stunning_report_v2_en1.pdf). Accessed online March 14th 2012.
  - Ernsting J (1963) The effect of brief profound hypoxia upon the arterial and venous oxygen tensions in man. *Journal of Physiology*, 169:292.
  - Ernsting J (1965) The effect of anoxia on the central nervous system. In: *A Text Book of Aviation Physiology*, J.A. Gillies (Ed.), Pergamon Press, Oxford, UK.
  - Forslid A (1992) Muscle spasms during pre-slaughter carbon dioxide anesthesia in swine. *Fleischwirtschaft*, 72: 167-168.
  - Gregory NG (1995) Recent developments in gas stunning pigs. *Meat Industry Research Conference*, 9B: 1-4
  - Gregory NG, Moss B and Leeson R (1987) An assessment of carbon dioxide stunning in pigs. *Veterinary Record*, 121: 517-518.
  - Gregory NG, Raj ABM, Audsley ARS and Daly CC (1990) Effects of carbon dioxide on man. In: The use of carbon dioxide for the stunning of slaughter pigs. Report of a meeting of experts held in Heeze from the 26-27<sup>th</sup> January 1990. *Fleischwirtschaft*, 70: 1173-1174.
  - Hartung J, Nowak B, Waldmann KH and Ellerbrock S (2002) CO<sub>2</sub> stunning of slaughter pigs: Effects on EEG, catecholamines and clinical reflexes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 109: 135-139.

- Manning H L and Schwartzstein R M (1995) Pathophysiology of Dyspnea. *New England Journal of Medicine*, 333: 1547-1553.
- Raj ABM (1999) Behaviour of pigs exposed to mixtures of gases and the time required to stun and kill them: welfare implications. *Veterinary Record*, 144: 165-168.
- Raj ABM and Gregory NG (1995) Welfare implications of the gas stunning of pigs 1. Determination of aversion to the initial inhalation of carbon dioxide or argon. *Animal Welfare*, 4: 273-280.
- Raj ABM and Gregory NG (1996) Welfare implications of gas stunning of pigs 2. Stress of induction of anaesthesia. *Animal Welfare*, 5: 71-78.
- Raj ABM, Johnson SP, Wotton SB and McInstry JL (1997) Welfare implications of gas stunning of pigs 3. The time to loss of somatosensory evoked potentials and spontaneous electrocorticogram of pigs during exposure to gases. *The Veterinary Journal*, 153: 329-340.
- Rodríguez P, Dalmau A, Ruiz-de-la-Torre JL, Manteca X, Jensen EW, Rodríguez B, Litvan H and Velarde A (2008) Assessment of unconsciousness during carbon dioxide stunning in pigs. *Animal Welfare*, 17: 341-349.
- Rushen J (1986) The validity of behavioural measures of aversion - a review. *Applied Animal Behaviour Science*, 16: 309-323.
- Rushen J (1996) Using aversion learning techniques to assess the mental state, suffering, and welfare of farm animals. *Journal of Animal Science*, 74: 1990-1995.
- Troeger K and Woltersdorf W (1991) Gas anaesthesia of slaughter pigs. Stunning experiments under laboratory conditions with fat pigs of known halothane reaction type: meat quality and animal protection. *Fleischwirtschaft*, 71: 1063-1068.
- Velarde A, Ruiz-de-la-Torre JL, Stub C, Diestre A and Manteca X (2000) Factors affecting the effectiveness of head-only electrical stunning in sheep. *Veterinary Record*, 147: 40-43.
- Velarde A, Cruz J, Gispert M, Carrión D, Ruiz-de-la-Torre JL, Diestre A and Manteca X (2007) Aversion to carbon dioxide stunning in pigs: effect of the carbon dioxide concentration and the halothane genotype. *Animal Welfare*, 16: 513-522.

**CAPÍTOL 4 / CHAPTER 4**

**Assessment of consciousness during Propofol anaesthesia in pigs**

**Chapter based on a paper published in Veterinary Record**

**2011 169: 496a.**

---





## 1 INTRODUCTION

Anaesthesia is required to allow major operative procedures to be undertaken without the animal experiencing pain. In some cases, the assessment of unconsciousness relies on behavioural patterns and physiological reflexes which need to be validated according to the brain activity. A wide variety of methods have been used to monitorize brain activity in animals (Haga and others 1999, Martín-Camacho and others 2006, Rodríguez and others 2008). However, most of them have been carried out when animals were restrained. The Index of Consciousness<sup>®</sup> (IoC, IoC-view<sup>®</sup>, Morpheus Medical, Spain) is a monitor based on wireless technology that can assess brain activity in non-restraining conditions. The IoC analyses the raw EEG giving a unitless scale from 0 (null brain activity) to 99 (awake) (Revuelta and others 2008). Burst Suppression (BS%), which appears when the brain cortex is deeply depressed (Haga and others 2002), is also assessed. The IoC-view<sup>®</sup> monitor is currently used in human patients (Revuelta and others 2008) and has also been used in veterinary medicine to successfully assess the depth of anaesthesia in dogs (Ribeiro and others 2009) and rabbits (Silva and others 2010). Propofol is an injectable anaesthetic agent that can be used both for anaesthetic induction and for maintenance (Glen and Hunter 1984, Watkins and others 1987) that has been used in some experiments aiming to monitorize the anaesthetic depth in dogs (Ribeiro and others 2009) and rabbits (Silva and others 2011). The aim of this study was to assess the brain activity during Propofol-induced anaesthesia in non-restrained pigs using the IoC-view<sup>®</sup> monitor and to correlate it with behavioural patterns and physiological reflexes.

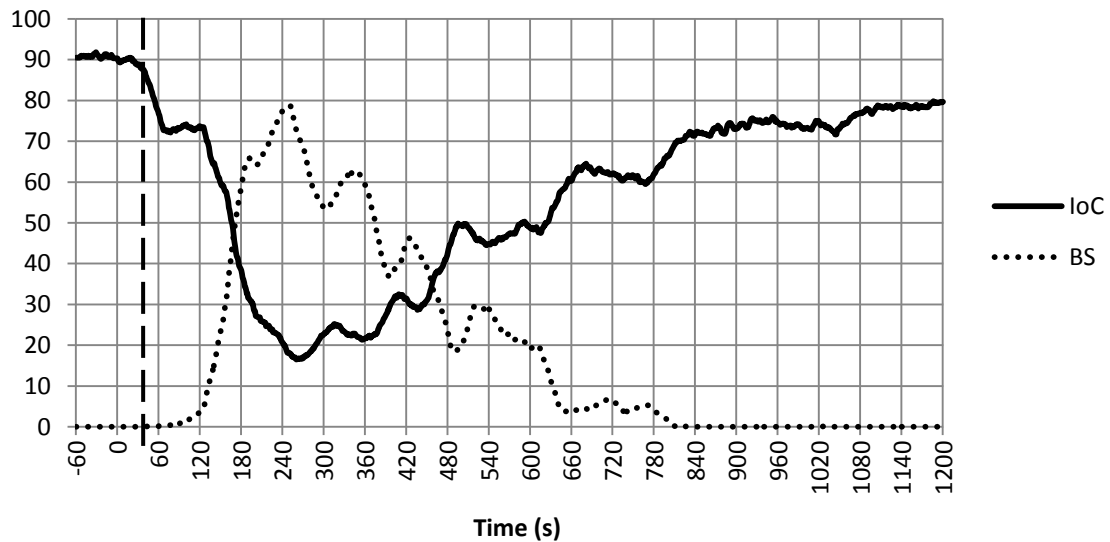
## 2 MATERIAL AND METHODS

The experiment was performed on six healthy pigs (Landrace x Large white x Pietrain) weighing  $95.0 \pm 12.25$  kg. Prior to anaesthesia, pigs were restrained and three EEG surface electrodes (Blue sensor, Ambu, Denmark) were stocked to the skin of each pig, at the level of the frontal bone. The IoC-view<sup>®</sup> monitor was then fitted to the electrodes to record EEG data. IoC and BS% data were transferred to a Pocket Personal Computer (iPAQ, HP, USA). At the same time, a 20-gauge catheter was placed into the left ear auricular vein and flushed with heparinised saline solution (0.9% NaCl, B. Braun, Spain). Afterwards, animals were left individually in a pen for 15 minutes, and the last 5 minutes the IoC and BS% recorded were taken as basal values. At the end of this

period, anaesthesia was induced by administering an intravenous dose of  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  of Propofol (Propofol Lipuro<sup>®</sup>, Braun, Spain), via the catheterized auricular vein at a rate of  $2.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  during 2 minutes. The time when the loss of balance occurred as well as the presence of corneal reflex were recorded related to the Propofol induction. For the data analysis, the basal IoC and BS% mean data, recorded during the 5 min prior to the anaesthesia, were compared to the values obtained each second during the anaesthesia, using a mixed model analysis (PROC MIXED) of SAS (SAS 9.1, 1999-2001). When the variance analysis showed significant differences ( $P < 0.05$ ), the comparison of least square mean values (LSMEANS) was adjusted to Tukey multiple comparison test. The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of IRTA approved the experimental protocol.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

The *IoC-view*<sup>®</sup> recordings were successful in all animals anesthetized. Cardenas (2008) suggested that *IoC-view*<sup>®</sup> have an update delay of 7 to 12 s between the state of awareness and IoC recording. In order to obtain the appropriate IoC and BS% that corresponds to each second, this delay was averaged in 10s. The mean basal IoC was  $90.8 \pm 1.47$  and the BS%  $0.0 \pm 0.00$ , which were similar to those obtained in human conscious patients (Revuelta and others 2008). The IoC decreased significantly from basal levels at  $41 \pm 31.4$  s after the start of the Propofol administration, with a value of  $85.7 \pm 2.94$  and a null BS%. This point in time may thus be indicative of the moment when brain activity started to decrease (Rodríguez and others 2008). Pigs took on average  $33.7 \pm 10.3$  s to lose balance (IoC of  $82.2 \pm 9.09$  and null BS%; Figure 1). So, although brain activity started to decrease significantly on average 7 s after the loss of balance, differences between both times were no significant. Therefore and as previously suggested by Raj and Gregory (1995), it is likely that the loss of balance might be related with the decrease in brain activity. Revuelta and others (2008) concluded that in humans the surgical anaesthesia was achieved when the IoC values ranged between 60-40. In our study, the IoC decreased below 60 from  $162 \pm 104.9$  s until  $421.2 \pm 251.13$  s after the beginning of the Propofol administration.



**Figure 1. Mean values of IoC and BS% during anaesthesia. The time to loss balance is shown with a bar.**

Anaesthesia can be also monitored using some physiological reflexes, such as corneal reflex (Haga and others 1999, Hartmann and others 2010). According to our results, 5 out of 6 animals lost the corneal reflex during anaesthesia ( $172.6 \pm 58.87$  s) and recovered it at  $300.8 \pm 70.18$  s after the end of Propofol administration. As said by Muir (2007), the loss of corneal reflex occurs during the third stage of anaesthesia, which is characterised by unconsciousness. However, in our study the majority of pigs (3 out of 5) lost the corneal reflex with an IoC higher than 60. However, according to Hall and others (2001) the absence of corneal reflex is not always a valid indicator of depth of anaesthesia and may still be present even for a short time after cardiac arrest has occurred. On the other hand, when the corneal reflex was absent, BS% was always present. Actually, BS% appeared  $127.2 \pm 64.38$  s after the induction and disappeared at  $525.3 \pm 215.47$  s. The relationship between corneal reflex and BS% was already found by Ribeiro and others (2009) who, using Propofol for anaesthetizing dogs, observed that the BS% appeared more consistently in patients that had lost the corneal reflex. The end of the anaesthesia was considered when IoC basal values were reached, which in all pigs occurred on average at  $1116 \pm 347$  s after the induction.

#### 4 CONCLUSIONS

In conclusion, under Propofol anaesthesia, the onset of unconsciousness as well as deep unconsciousness, are predicted by the IoC-view<sup>®</sup> recordings. However, further research

would be needed to find other indicators able to monitorize the progressive loss of consciousness and correlate with the IoC.

## 5 ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (AGL2005 – 06671 – CO2 – 01).

## 6 REFERENCES

Cardenas K (2008) Analysis of the update delay over time for changes in the Index of Consciousness of the IoC-view<sup>®</sup> monitor. Morpheus Medical

Glen J B and Hunter SC (1984) Pharmacology of an emulsion formulation of ICI 35868. *British Journal of Anaesthesia*, 56: 617-625.

Haga AH, Tevik A and Moersch H (2002) Bispectral index as an indicator of anaesthetic depth during isoflurane anaesthesia in the pig. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 29: 69-75.

Hall LW (2001) Patient monitoring and clinical measurement. In *Veterinary Anaesthesia* (Third edition). W. B. Saunders, Philadelphia, USA.

Hartmann H, Rindermann G, Siegling-Vlitakis C, Arndt G, Wolf K and Fries R (2010) Relationship between the response to the corneal reflex (depth of narcosis) and specific parameters in the slaughter blood of pigs narcotised with CO<sub>2</sub>. *Animal Welfare*, 19: 515-522.

Martín-Cancho MF, Lima JR, Luis L, Crisóstomo V, López MA, Ezquerra LJ, Carrasco-Jiménez MS and Usón-Gargallo JS (2006) Bispectral index, spectral edge frequency 95% and median frequency recorded at varying desflurane concentrations in pigs. *Research in Veterinary Science*, 81: 373-381.

Muir, WW (2007) Considerations for general anaesthesia. In *Lumb and Jones Veterinary Anaesthesia and Analgesia* (Fourth edition). W. J. Tranquilli, J. C. Thurmon, K. A. Grimm (Eds.). Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Raj ABM and Gregory NG (1996) Welfare implications of gas stunning of pigs 2. Stress of induction of anaesthesia. *Animal Welfare*, 5: 71-78.

---

Revuelta M, Paniagua P, Campos JM, Fernández JA, Martínez A, Jospin M and Litvan H (2008) Validation of the index of consciousness during sevoflurane and remifentanyl anaesthesia: a comparison with the bispectral index and the cerebral state index. *British Journal of Anaesthesia*, 101: 653-658.

Ribeiro LM, Ferreira DA, Brás S, Castro A, Nunes CA, Amorim P and Antunes LM (2009) Correlation between clinical signs of depth of anaesthesia and cerebral state index responses in dogs during induction of anaesthesia with propofol. *Research in Veterinary Science*, 87: 287-291.

Rodríguez P, Dalmau A, Ruiz-De-La-Torre JL, Manteca X, Jensen EW, Rodríguez B, Litvan H and Velarde A (2008) Assessment of unconsciousness during carbon dioxide stunning in pigs. *Animal Welfare*, 17: 341-349.

Short CE and Bufalari A (1999) Propofol Anaesthesia. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 29: 747-778.

Silva A, Ferreira DA, Venâncio C, Souza AP and Antunes LM (2011) Performance of electroencephalogram-derived parameters in prediction of depth of anaesthesia in a rabbit model. *British Journal of Anaesthesia*, 106: 540-547.

Watkins SB, Hall LW and Clarke KW (1987) Propofol as intravenous anaesthetic agent in dogs. *Veterinary Record*, 120: 326-329.



**CAPÍTOL 5 / CHAPTER 5**

**Assessment of unconsciousness in pigs during exposure to nitrogen and carbon  
dioxide mixtures**

**Chapter based on a paper sent to Animal  
(In Press)**

---





**ABSTRACT**

The aim of this study was to assess unconsciousness in pigs during and after the exposure to gas mixtures of 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C) compared to 90% CO<sub>2</sub> in air (90C) by means of the Index of Consciousness<sup>®</sup>, their behaviour and the absence of brain stem reflexes. The experiment included three trials of 24 pigs divided into four groups according to the number of treatments. Half of the group was exposed for a short time and the other half for a long time (3 and 5 min for the N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixtures exposure and 2 and 3 min in 90C exposure respectively). During exposure, the Index of Consciousness (IoC) and the EEG Suppression Rate (ESR) were assessed as well as the time to onset and percentage of gasping, loss of balance, vocalizations, muscular excitation and gagging. At the end of the exposure, the corneal reflex, rhythmic breathing and sensitivity to pain were assessed each 10 s during 5 min. Brain activity decreased significantly ( $P < 0.05$ ) 37.60 s after the start of the exposure to 90% CO<sub>2</sub> which was significantly earlier than in 70N30C, 80N20C and 85N15C exposure, (45.18 s, 46.92 s and 43.27 s, respectively). Before brain activity decreased, all pigs performed gasping and loss of balance and a 98% muscular excitation. The duration of the muscular excitation was longer in animals exposed to 70N30C, 80N20C and 85N15C than 90C ( $P < 0.01$ ). After long exposure time, all animals exposed to 90C died whereas the 30.4% of animals exposed to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures survived. Pigs exposed to 85N15C recovered corneal reflex and sensitivity to pain significantly earlier than 90C. The exposure to 90C causes a higher aversive reaction but a quicker loss of consciousness than N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures. Exposure to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures causes a lower percentage of deaths and an earlier recovery of the brain stem activity than 90C, whereas the time to recover the cortical activity is similar. In the conditions of this study, when pigs are exposed to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures, the aversion was reduced compared to high concentrations of CO<sub>2</sub>; however the use of the N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures increased the time to induce unconsciousness and reduced the time to appear symptoms of recovery.



## 1 INTRODUCTION

Stunning before slaughter is a statutory requirement in Europe (Council Regulation (EC) 1099/2009). It is performed to induce unconsciousness and insensibility in animals so that slaughter could be performed without causing any avoidable anxiety, pain, suffering or distress to the animals (EFSA, 2004). One of the main used methods for stunning pigs in Europe is the exposure to an atmosphere with high concentration of carbon dioxide (>80% CO<sub>2</sub> in air). Animals are introduced individually or in group into a crate and descended into a pit prefilled with high concentrations of CO<sub>2</sub>. However, the inhalation of high concentration of CO<sub>2</sub> compromises animal welfare as it does not cause immediate loss of consciousness (Raj and Gregory, 1995) and the inhalation of CO<sub>2</sub> in pigs produces irritation of the nasal mucosal membranes (Gregory *et al.*, 1990), hyperventilation (Gregory *et al.*, 1987) and breathlessness (EFSA, 2004). Different authors suggested that during the induction to unconsciousness by CO<sub>2</sub> inhalation, pigs perform retreat and escape attempts (Raj and Gregory, 1996; Velarde *et al.* 2007), vocalisations (EFSA 2004) and gasping (Raj and Gregory 1996; Lambooij *et al.* 1999) which are behavioural indicators of aversion.

Exposure to anoxia (<2% O<sub>2</sub> by volume in atmospheric air) using inert gases (i.e. argon or nitrogen), has been considered an alternative to high concentration of CO<sub>2</sub> as it reduces aversion (Raj and Gregory, 1995; Dalmau *et al.*, 2010b; Llonch *et al.*, 2012). The inhalation of an anoxic atmosphere causes neuronal depolarisation and intracellular metabolic crisis leading to cellular death in neurons (Rosen and Morris, 1991; Huang *et al.*, 1994). Actually, brain oxygen deprivation leads to accumulation of extra-cellular potassium and a metabolic crisis as indicated by the depletion of energy substrates and accumulation of lactic acid in the neurons (EFSA, 2004). The mechanism of induction of unconsciousness by hypoxia is due to the inhibition of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels in the brain, which is essential for maintaining neuronal arousal during conscious state (EFSA, 2004). However, the time to induce unconsciousness when exposed to anoxia is longer (54 s) than when exposed to hypercapnia (>80% CO<sub>2</sub>) (32 s) (Raj *et al.*, 1997). In order to reduce the time to unconsciousness, Gregory (1995) proposed adding low concentrations of CO<sub>2</sub> to the anoxic atmosphere for producing a hypercapnic hypoxia.

Some studies suggest that nitrogen (N<sub>2</sub>) can be used to stun pigs by anoxia (Dalmau *et al.*, 2010b; Llonch *et al.*, 2011). Actually, atmospheric air contains 79% of N<sub>2</sub> which may suggest that its inhalation at high concentration is not aversive. However, high concentration of N<sub>2</sub> (>90%) in atmospheric air has a low stability, defined as the capability of the gas to be sustained within the pit in the existing stunning systems without being displaced by atmospheric air (Dalmau *et al.*, 2010a). This is due to the low relative density of the N<sub>2</sub> (0.97) compared to air, which makes it easy to rise from the bottom of the pit (Dalmau *et al.* 2010a). The same authors reported that adding CO<sub>2</sub> to high N<sub>2</sub> concentration atmosphere increases the stability of the gas mixture. However, CO<sub>2</sub> concentrations higher than 30% have been reported to be aversive (Raj and Gregory, 1995), which limits the CO<sub>2</sub> concentration that can be added to the gas mixture.

Raj *et al.*, (1997) assessed the brain activity in pigs anaesthetised with a gas mixture of argon with up to 30% CO<sub>2</sub>. However, the brain activity in pigs exposed to different mixtures of nitrogen and up to 30% of CO<sub>2</sub> have not yet been studied.

The onset of unconsciousness can be assessed by measuring the electroencephalographic (EEG) activity (Wotton and Gregory, 1986; Gerritzen *et al.*, 2008). Numerical indexes, based on the objective assessment of the EEG have been used by several authors to assess unconsciousness during stunning (Raj *et al.*, 1997; Martoft *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2008). They provide an on-time index of the brain activity that reports, by means of a numerical scale, the state of consciousness of the individual.

The Index of Consciousness<sup>®</sup> (IoC, IoC-view<sup>®</sup> monitor, Morpheus Medical, Barcelona, Spain) is an algorithm that analyses the raw EEG with a unitless scale from 0 (isoelectric EEG, coma) to 99 (awake) (Revuelta *et al.* 2008). The IoC-view<sup>®</sup> monitor is currently used in human patients (Revuelta *et al.* 2008) but has also been used in rabbits (Silva *et al.*, 2011) and pigs (Llonch *et al.*, 2011). Moreover, the wireless technology of the IoC-view<sup>®</sup> allows the assessment of the brain activity in non restrained animals in conditions similar to those found in commercial slaughterhouses.

According to Holst (2002), unconsciousness can also be assessed by the absence of the brain stem reflexes (such as corneal reflex and rhythmic breathing) and sensitivity by means of the reflex response to pain. The advantage of these reflexes is that they can be

easily monitored in the slaughterhouse once the animals get out of the stunner crate. However, in order to be a valid indicator of unconsciousness at stunning in commercial conditions they need to be assessed and correlated with the brain activity.

The aim of this study was to assess unconsciousness in pigs during and after the exposure to the gas concentrations of 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C) compared to 90% CO<sub>2</sub> in air (90C) by means of the Index of Consciousness<sup>®</sup>, their behaviour and the absence of brain stem reflexes.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Animals

The study included 3 trials of 24 commercially crossbred female pigs each. The mean live weight of the pigs was  $93.0 \pm 7.25$  kg (mean  $\pm$  SD). The animals were transported to the experimental facilities three days before the start of each trial. On arrival, the animals were divided into the four treatment groups of six animals housed in separate pens of 18.2 m<sup>2</sup> (8.3x2.2 m). Water and food were available *ad libitum* but pigs were fasted 12 hours before the experimental procedure.

### 2.2 Facilities

The experiment was carried out at the experimental slaughterhouse of IRTA-Monells, next to the housing pens, and equipped with a Dip Lift CO<sub>2</sub> stunning unit (Butina, Alps, Copenhagen, Denmark) that has a crate that descends into a well of 260 cm depth and 8 m<sup>3</sup> of volume. The CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> concentrations were controlled and mixed with two flowmeters (R-300-G Inox, Maquinsa, Madrid, Spain) at three bars of pressure, and a flow rate of 16 Nm<sup>3</sup>/h (Dalmau *et al.*, 2010a). The CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentration at 120 cm depth were monitored with a portable infrared and electrochemical sensor, respectively (Map Check Combi O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, PBI-Dansensor, Barcelona, Spain). The housing pens were connected to the stunning unit by a straight corridor of 412 cm length and 60 cm wide.

### 2.3 Stunning and recording procedures

Each treatment group was stunned with one of the following gas mixtures: 90C, 70N30C, 80N20C and 85N15C, all with less than 2% O<sub>2</sub> by volume in atmospheric air.

Each trial was carried out during 4 consecutive experimental days, one per treatment. The order of the gas mixtures among the 4 days in each trial was randomly selected. During the experimental day, each pig was randomly moved to an adjacent pen without other animals. There, it was restrained with a snare and its head skin shaved and cleaned. Afterwards, three EEG surface electrodes (Blue sensor, AMBU, Denmark) were implanted at the level of the frontal bone. Once all EEG electrodes were properly placed, the IoC-view<sup>®</sup> monitor was attached to the hind part of the abdomen with an elastic bandage to avoid any damage during the experiment. After that, the pig was left during 10 minutes in the pen so that it could calm down to record the basal EEG. Afterwards, the pig was moved to the corridor and allowed to enter voluntarily into the stunning crate. After 30 s, if the pig had not entered the crate, it was gently pushed inside. Half of the group exposed to 70N30C, 80N20C and 85N15C were exposed to the gas mixture during 3 min (short period) and the others to 5 min (long period). Pigs exposed to 90C were also divided into two groups and according to the time of exposure of 2 and 3 min period each. Each pig was subjected to only one gas treatment. The crate descended to the bottom of the well for 23 s, remained stationary during 74 s (two min exposure), 134s (three min exposure) and 254 s (5 min exposure) and ascended for 23 s to the floor. All recording times were synchronised with the time at which the pig started the descent into the well. Groups of 8 and 9 animals were alternated between short and long exposure among all treatments.

### 2.4 Measurements

The EEG was recorded from 10 min before the exposure until the basal IoC levels were achieved or when death was certified after the exposure. The IoC and the Electric Suppressions Rate (ESR) were calculated on line from the EEG by the IoC-view monitor (Revuelta *et al.*, 2008). The ESR reflects the isoelectric EEG activity interrupted by brief periods of high amplitude EEG activity that indicates a non-specific reduction in cerebral metabolic activity (Rampil, 1998), and that appears during deep anaesthesia (Schaul, 1998). An example of the data available for each pig is presented in Figure 1. The IoC was calculated by an algorithm based on the EEG and the ESR of the data recorded during the last 7 to 12 s (Cardenas, 2007). In order to correlate the time of the IoC to the onset of the behavioural and physiological reflexes, the IoC recordings were delayed an average of 10 s (Llonch *et al.*, 2011).

The behaviour of the animal in the stunning system was recorded by means of a videocamera (Sony Colour CCD AVC 565, Circontrol, Barcelona, Spain) placed on the roof of the crate and connected to a digital image recorder (VDVR-4S 550430, Circontrol, Barcelona, Spain). The video records were subsequently analysed using behaviour analysis software (Observer XT 9, Noldus, Wageningen, The Netherlands). The behavioural measures assessed were:

- **Gasping:** A very deep breath through a wide open mouth which may involve stretching of the neck. It is considered an indicator of onset of breathlessness (Velarde *et al.*, 2007).
- **Loss of balance:** Defined by the inability of the animal to remain in a standing position and considered the first indicator of onset of unconsciousness (Raj and Gregory, 1996).
- **Vocalizations:** shouts or snores emitted by the animal during the induction of unconsciousness (EFSA, 2004; Rodriguez *et al.*, 2008).
- **Muscular excitation:** defined as a period of struggling ranging from fairly vigorous running and jumping movements to clonic convulsive seizures (Dodman, 1977).
- **Gagging:** low frequency inhalations with the neck towards the front legs and occasional emitting of sounds similar to snoring (Rodriguez *et al.*, 2008). It has been considered an indicator of deep unconsciousness (Gregory, 1993).

After stunning, responsiveness to pain stimulus and presence of rhythmic breathing and corneal reflex were assessed each 10 s interval until 5 min after the end of the exposure. Corneal reflex was measured by touching the cornea with a blunt object; the response to pain stimulus was performed by a nose prick and assessing the blinking response, and the rhythmic breathing was visually assessed according to the movements of the flank. Those animals that after the end of exposure showed IoC values close to 0 and absence of all three reflexes, were considered dead. Pigs that recovered consciousness were moved to the pen and euthanized after the end of the experiment.

The experimental protocol was approved by the IACUC of IRTA which is authorized by the Spanish Authority of Animal Husbandry.

## 2.5 Statistical Analysis

Data were analyzed with the Statistical Analysis System (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1999-2001). Latency (such as time of the first gasping, loss of balance, vocalization, onset and duration of muscle excitation as well as the time to reappear the pain sensitivity, rhythmic breathing and corneal reflex), IoC and ESR data were analysed using a mixed model ANOVA (PROC MIXED) with a covariance structure of compounds symmetric (CS) with “gas mixture” and “time of exposure” as fixed effects. The “trial” as a random effect was included in the model. When the analysis of variance showed significant differences ( $P < 0.05$ ) a least square means comparison test (LSMEANS) adjusted to multiple comparison test of Tukey was carried out.

Binary data (presence of gasping, vocalization, muscular excitation, pain sensitivity, rhythmic breathing, corneal reflex and number of dead pigs) was analyzed using a generalized linear model of ANOVA (PROC GENMOD) following a binomial distribution. “Gas mixture” and “time of exposure” were considered the fixed effects.

The correlation by means of the PROC CORR procedure between the different measures of behaviour and IoC were also analysed. In all cases, significance was assumed at  $P < 0.05$ .

## 3 RESULTS

### 3.1 Brain activity

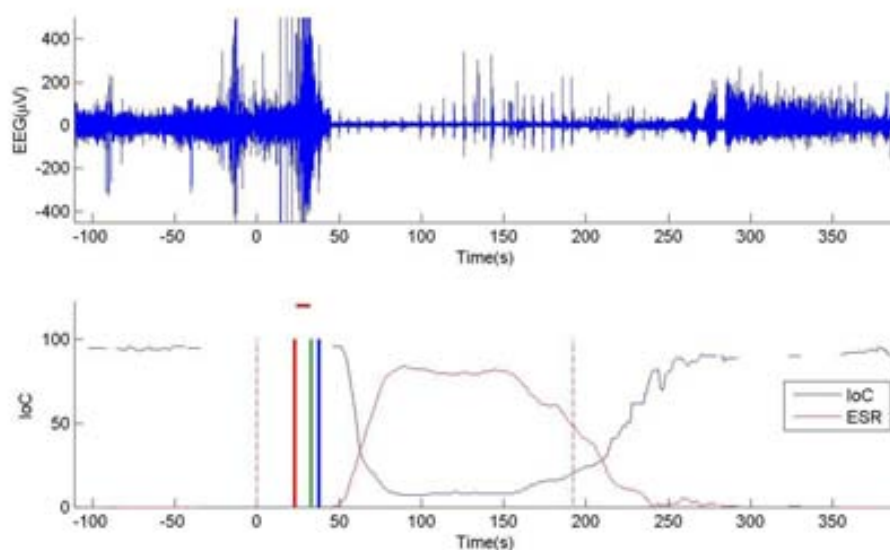
The IoC and ESR were successfully recorded in 56 out of 72 pigs. In the other animals, the IoC and ESR data were lost during the muscular excitation phase. Among the successfully recorded animals, 17 were exposed to 70N30C, 13 to 80N20C, 11 to 85N15C and 15 to 90C. The average basal IoC was  $95.5 \pm 0.47$  and the ESR was  $0.0 \pm 0.00$ , without differences among treatments. After the start of the exposure, the IoC decreased significantly ( $P = 0.002$ ) from basal levels earlier in the animals exposed to 90C ( $37.6 \pm 2.25$  s) than in those exposed to 70N30C ( $45.2 \pm 1.83$  s), 80N20C ( $46.9 \pm 2.28$  s) and 85N15C ( $43.3 \pm 2.36$  s). The animals with long exposure time showed significantly ( $P = 0.001$ ) lower IoC value ( $0.8 \pm 0.32$ ) than with the short exposure time ( $3.7 \pm 0.71$ ). The minimum value were reached significantly later ( $P < 0.001$ ) during long exposure ( $257.2 \pm 19.45$  s) than during short exposure ( $138.6 \pm 11.60$ ).



The ESR appeared on average at  $40.7 \pm 1.90$  s after the start of induction. The animals exposed to a long period showed higher maximum values of this rate than the short period ( $98.7 \pm 0.64$  vs  $91.2 \pm 1.72$ , respectively). No differences were shown between the gas mixtures assessed in time to get the maximum values ( $204.5 \pm 14.08$  s).

The percentage of dead animals after the inhalation was affected by the gas mixture ( $P < 0.01$ ) and the time of exposure ( $P < 0.001$ ). All pigs exposed to 90C for the long exposure died whereas 75% of those exposed to the short exposure recovered consciousness. Any pig exposed during short period to 70N30C, 80N20C and 85N15C died, whereas after the long exposure, 69.6% of the animals died, without differences between  $N_2/CO_2$  treatments.

At the end of exposure, the time to recover the IoC basal values was shorter ( $P = 0.032$ ) in the short exposure ( $140.6 \pm 16.90$  s) than in the long one ( $179.0 \pm 26.68$  s) but no differences were found between the gas mixtures.



**Figure 1. Example of a raw EEG and the IoC and ESR graphs during the recovery and exposure in pigs exposed to 80N20C. Onset of gasping, vocalisations and loss of balance marked with a red, green and blue bar respectively. The exposure time corresponds to the interval between the spotted bars.**

### 3.2 Behaviour

The percentage of animals performing gasping was lower when exposed to 85N15C than 70N30C ( $P = 0.031$ ) and 90C ( $P = 0.011$ ) (Table 1). However, the onset of this

behaviour was similar between gas mixtures and exposure time ( $21.1 \pm 1.02$  s), and occurred before the IoC differed significantly from baseline in all pigs assessed. The pigs exposed to 90C lost balance earlier ( $22.3 \pm 0.49$  s) than those exposed to 70N30C ( $25.4 \pm 0.69$ ), 80N20C ( $24.5 \pm 0.75$  s) and 85N15C ( $26.4 \pm 0.49$  s) but this parameter was not affected by the exposure time. The loss of balance occurred while the IoC maintained the basal values in a 98.2% of the animals. However, the time to loss balance and the time that the IoC started to decrease were correlated ( $r=0.40$ ;  $P=0.007$ ) and, on average, the IoC decreased significantly below basal levels at  $18.7 \pm 1.12$  s after loss of balance. Fifty five out of 56 animals showed muscular excitation. It started earlier ( $P=0.0002$ ) in 90C ( $23.6 \pm 0.88$  s) than in 70N30C ( $27.8 \pm 1.18$  s), 80N20C ( $26.4 \pm 0.66$  s) and 85N15C ( $28.9 \pm 1.90$  s) treatments. At the onset of muscular excitation, the IoC had not significantly decreased from basal levels in a 96.4% of the animals. The duration of the muscular excitation phase was longer in animals exposed to 70N30C ( $P=0.007$ ), 80N20C ( $P=0.003$ ) and 85N15C ( $P=0.002$ ) than 90C (Table 2) without differences between exposure times. During muscular excitation, the EEG was contaminated by muscular activity artefacts defined by high amplitude waves. The percentage of animals that vocalized after loss of balance, was significantly lower when exposed to 90C (40%) than to 70N30C (94.1%;  $P=0.006$ ), 80N20C (92.3%;  $P=0.013$ ) and 85N15C (90.9%;  $P=0.021$ ) (Table 1). Vocalizations started on average at  $34.1 \pm 1.17$  s without differences among treatments or duration of exposure. However, the percentage of pigs that vocalised while the IoC showed basal levels was lower in 90C compared to 70N30C ( $P=0.003$ ), 80N20C ( $P=0.012$ ) and 85N15C ( $P=0.026$ ) (Table 1).

**Table 1. Percentage of pigs performing gasping and vocalisations during the exposure to 70N30C, 80N20C, 85N15C and 90C gas mixtures.**

	70N30C	80N20C	85N15C	90C	P
Gasping (%)	70.58 <sup>a</sup>	53.84 <sup>ab</sup>	27.27 <sup>b</sup>	80.0 <sup>a</sup>	*
Vocalisations (%)	94.11 <sup>a</sup>	92.31 <sup>a</sup>	90.91 <sup>a</sup>	40.0 <sup>b</sup>	**

Means with different superscripts letters are significantly different among gas mixtures.

\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ .

All animals showed gagging at  $48.3 \pm 1.85$  s after the start of gas exposure. In a 38.2% of those animals, gagging occurred when the IoC was not significantly different from basal level, without differences between treatments nor exposure times. Gagging

occurred on average  $5.07 \pm 0.56$  s after the beginning to decrease of the IoC and  $7.6 \pm 2.33$  s after the onset of ESR increase.

### 3.3 Physiological reflexes

Rhythmic breathing was present in 19.6% of the live animals (n=31) just after the end of exposure. The rest recovered it on average at  $15.9 \pm 3.33$  s after the end of the exposure when the IoC value was on average  $15.6 \pm 1.56$  without differences between treatments or time of exposure.

Corneal reflex was already present at the end of the exposure in 25% of the live pigs. Pigs exposed to 85N15C recovered it earlier (P=0.049) than 90C (Table 2) but no differences were found between exposure duration. No differences were found between treatments or times of exposure in the average IoC value ( $18.5 \pm 1.90$ ) when pigs recovered the corneal reflex.

Among pigs that survived to the anaesthesia, 10.71% showed sensitivity to pain. In those that did not initially show this reflex, sensitivity to pain appeared earlier in 85N15C than 90C (P=0.034) but no differences were found between the exposure duration (Table 2). The average IoC value when pigs recovered the sensitivity was  $22.1 \pm 3.99$  without differences between treatments or exposure duration.

**Table 2. Mean and standard error of the time (s) of duration of the muscular excitation during the exposure and time (s) to perform corneal reflex and response to pain after exposure to 90C, 70N30C, 80N20C and 85N15C.**

	Gas mixtures			
	70N30C	80N20C	85N15C	90C
Duration of muscular excitation (s)	$13.5 \pm 0.57^a$	$14.2 \pm 0.79^a$	$14.7 \pm 0.78^a$	$8.5 \pm 0.87^b$
Corneal reflex (s)	$13.3 \pm 7.64^{ab}$	$28.8 \pm 8.54^{ab}$	$3.8 \pm 1.83^b$	$48.3 \pm 26.13^a$
Pain response (s)	$40.0 \pm 11.55^{ab}$	$58.8 \pm 14.93^{ab}$	$28.6 \pm 16.10^b$	$95.0 \pm 26.80^a$

Means with different superscripts letters are significantly different among gas mixtures (P<0.05).

#### 4 DISCUSSION

To ascertain the aversiveness of a gas mixture, the consciousness of the exposed individual needs to be assessed and correlated with the behaviour that performs during the exposure. In addition, before the implementation of any gas mixture for stunning on commercial conditions, it is necessary to know the required exposure time to induce unconsciousness until brain death caused by bleeding. Brain activity during the induction to unconsciousness and the recovery was monitored by means of the Index of Consciousness (IoC-*view*<sup>®</sup>) as well as the brain stem reflexes such as rhythmic breathing and corneal reflex and sensitivity to pain.

The IoC is calculated by a fuzzy logic combination of features extracted from the raw EEG that takes into account the wave amplitude and frequency of the EEG and the ESR (Revuelta *et al.*, 2008). The validity of the IoC is based on the capacity to detect the brain activity related to the clinical state of consciousness. Anaesthesia, defined as a procedure that allows intentional change of the state of consciousness, has been used to assess the IoC performance. The results obtained by Llonch *et al.* (2011) during suggest that the IoC-*view*<sup>®</sup> is able to assess the brain activity during anaesthesia in pigs.

The main methods used to measure brain activity are the Auditory and the Somatosensory Evoked Potentials (AEP or SEP), which are based on the assessment of the integration of the external inputs by the brain cortex. Raj *et al.* (1997) exposed pigs to argon and CO<sub>2</sub> gas mixtures and monitored the pigs' brain activity by the SEP and stated that pigs that were exposed to 80% CO<sub>2</sub>, lost brain responsiveness later (21 s) than those exposed to 30% CO<sub>2</sub> and 60% of argon in air, (17 s) and to 90% argon (15 s). Martoft *et al.* (2001), using the AEP, concluded that pigs exposed to 90% CO<sub>2</sub> lost brain responsiveness on average at 14 s.

According to the IoC-*view*<sup>®</sup> results, pigs showed a decrease in brain activity at 37.6 s, 45.2 s, 46.9 s and 43.3 s after the start of the exposure to 90C, 70N30C, 80N20C and 85N15C, respectively. This delay in the onset of unconsciousness compared to Raj *et al.* (1999) and Martoft *et al.* (2001) results was also found by Rodriguez *et al.* (2008) who monitored the brain activity using AEP, and concluded that the onset of unconsciousness occurred after 60 s of exposure to 90 CO<sub>2</sub>. Raj *et al.* (1999) and Martoft *et al.* (2001) obtained different results, but in both studies pigs were hanged in a hammock and rapidly immersed in a box that contained the modified atmosphere.

However, in our experiment as well as in that by Rodriguez *et al.* (2008), the methodology of the gas exposure simulated commercial conditions, where pigs are immersed gradually to the required concentration in the base of a pit. It is likely then, that a rapid exposure to the gas mixture will induce a quicker loss of consciousness.

In addition to that, in our experiment, the presence of muscular excitation seemed to delay the decrease of the IoC calculation. Just after the loss of balance, 98.2% of the pigs showed muscular excitation. These muscular movements embedded the EEG with sparks of muscular activity which disrupt the IoC calculation and stretches the delay.

In accordance with this finding, in our study the time to loss balance, considered the first indicator of the onset of unconsciousness (Raj and Gregory, 1995), occurred on average 18 s earlier than the brain activity decrease. However, in pigs anaesthetised with propofol (which do not perform muscular excitation), the loss of balance occurred on average 7 s before the brain activity decrease (Llonch *et al.*, 2012a). Even though it is likely that the loss of balance occurs when the brain activity is still around basal values, the differences between both studies reveals that muscular excitation artefacts delay the decrease of the IoC below basal levels.

The unconsciousness caused by anoxia is due to a depression in the activity of the rostral reticular formation, which controls the state of arousal (Raj *et al.*, 1997). On the other hand, hypercapnia produces cortical arousal by a direct effect on the mesoencephalic structures and this suppresses the normal synchronization of electrical activity (Mountcastle, 1980). In previous studies (Raj *et al.* 1997), unconsciousness was induced in pigs with 90% argon, a mixture of 60% argon and 30% CO<sub>2</sub>, and 90% CO<sub>2</sub>, and concluded that the time to loss AEP was lower when exposed to anoxia or hypercapnic anoxia than hypercapnia. Inversely, our results suggest that the brain activity decreased earlier in 90C than in nitrogen and CO<sub>2</sub> mixtures. Moreover, the time to loss balance was also shorter in 90C than in N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixtures. The fact that hyperventilation is faster and deeper in high concentration carbon dioxide atmosphere may result in increased gas intake and shorten the induction period and time to loss of consciousness (Forslid, 1992). Therefore, it is likely that exposure to high concentrations of CO<sub>2</sub> causes a quicker depression of the CNS and the loss of consciousness compared to nitrogen and CO<sub>2</sub> mixtures.

When the muscular excitation started, the IoC was similar to basal levels in 96% of the pigs. The IoC maintained the basal values during the whole muscular excitation phase, and the onset of brain activity was reached after the end of this phase. Zeller *et al.* (1987) and Rodríguez *et al.* (2008) stated that the physical activity during CO<sub>2</sub> exposure might be an aversive response to the respiratory distress induced by the gas inhalation. On the other hand, Forslid (1987) concluded that the struggling movements of the muscular excitation phase are convulsions that occur during unconsciousness. Our results suggest that the muscular excitation during gas mixtures exposure could start as an aversive response to the atmosphere, defined by vigorous escape attempts, and continued as convulsions during unconsciousness.

Pigs exposed to 90C started the muscular excitation phase earlier than the pigs exposed to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures. This fact could be due to a more pronounced aversive reaction to the inhalation of high concentrations of CO<sub>2</sub>, which has been already mentioned by different authors (Raj *et al.*, 1996; Velarde *et al.* 2007; Llonch *et al.*, 2012b).

The duration of the muscular excitation phase was longer in animals exposed to the N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures than to 90C. It has been stated that convulsions are caused by the release of the caudal reticular formation in the higher neuronal centres (Ernsting, 1965) and that anoxia is more efficient than hypercapnia in abolishing the suppressive activity of higher centres contributing to a longer period of convulsions (Raj, 1999). Consequently, the period of convulsions during hypercapnic hypoxia is prolonged compared to hypercapnia, which enhance the duration of the whole muscular excitation phase.

Gasping, used as an indicator of the sense of breathlessness, occurred before the decrease of the brain activity. According to our results, 80% of the animals exposed to 90C showed gasping whereas this percentage decreased significantly in animals exposed to 85N15C (27.3%). Compared to hypoxia, hypercapnia is a more potent respiratory stimulant (Raj, 2008) and therefore, an increase of the CO<sub>2</sub> concentration in the atmosphere provokes a rise of the sense of breathlessness (EFSA, 2004; Velarde *et al.* 2007; Llonch *et al.* 2012a).

In the present study, the number of animals that vocalised was higher when exposed to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures than to 90C. In conscious animals, vocalisation is an indicator of stress (Raj *et al.*, 1997). In a commercial pig slaughterhouse, Gregory *et al.* (1987)

observed that the majority of pigs vocalised during the inhalation of high concentrations of CO<sub>2</sub> while they were conscious. In contrast, Raj (1999) concluded that vocalisations during exposure to argon, argon/CO<sub>2</sub> mixture and 80% CO<sub>2</sub> occurred while unconscious given that they appeared just before the loss of SEP's and before gagging. In the present study, vocalisations occurred during muscular excitation, thus making the assessment of brain activity difficult. Nevertheless, when vocalisations occurred, any of the circumstances described by Raj *et al.* (1997) happened, so it could not be demonstrated that animals were unconscious when vocalised and that they are not signs of aversion.

During the exposure to all gas mixtures, gagging appeared on average 5 s after the brain activity started to decrease and 7 seconds after the onset of ESR. These results seem to confirm that gagging is a rudimentary brain stem response occurring in association with the process of exhalation that take place when general anaesthesia is achieved. Consequently, after an exposure to a hypercapnia or hypercapnic anoxia, it can be considered as an indicator of unconsciousness.

According to the results of the IoC, a prolonged exposure to hypercapnia or hypercapnic anoxia induced a deep unconsciousness leading to death in some animals. The higher percentage of dead animals occurred in the 90C compared to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures but also in the longest time of exposure. This increase in the percentage of dead animals could be due to the deeper inhibition of the respiratory centre during hypercapnia. The metabolic crisis due to brain oxygen deprivation causes depolarisation of neurons within few seconds of inhalation of an anoxic agent (Raj, 2004) which, if long enough, leads to neuron death. However, the survival times of various parts of the brain may differ according to the regional oxygen consumption rate. For example, the survival time of the medulla, where the respiratory centre is located, is one of the longest among all brain structures. Thus, normal brain activity may be restored in anoxia-stunned animals if oxygen is administered or if they are allowed to breathe atmospheric air. On the other hand, after inhalation of high concentrations of CO<sub>2</sub>, apart from recovering O<sub>2</sub> blood levels, the LCR pH has to be restored to basal values which could take longer. Inevitably, the recovery of consciousness is quicker (Raj, 1999) and more frequent in hypercapnic anoxia than hypercapnia.

After the end of the exposure, the IoC reveals that the normal brain activity was restored later in the long exposure than in the short one but no differences were found between gas mixtures. This effect of the exposure duration is consistent with the number of dead

animals since the metabolic crisis caused by the gas mixtures inhalation increases with the rise of the time of exposure. Hence, the time to recuperate the homeostasis will be also higher in longer than in shorter exposures. Regarding the effect of treatment in the animals that recovered, the time to get the basal brain activity showed a great variation. This individual variability could mask the effect of the gas mixture masking significant differences between them.

In commercial conditions, alternatives to the EEG-based assessment of consciousness that have been used to assess the effectiveness of stunning are the brain stem reflexes such as corneal reflex, rhythmic breathing and sensitivity to pain (Gregory *et al.*, 1987; Raj, 1999; Velarde *et al.* 2007). In contrast to the results of the IoC, an effect of the gas mixture was observed in the time to recover some brain stem reflexes. The time to recover corneal reflex and response to pain stimulus were shorter in animals exposed to gas mixtures with less CO<sub>2</sub> (85N15C) compared to the other gas mixtures, suggesting that higher CO<sub>2</sub> concentration induces longer periods of unconsciousness.

After the gas mixture exposure, the appearance of the brain stem reflexes was not correlated with the brain activity. For instance, rhythmic breathing, corneal reflex and sensitivity to pain appeared when the IoC was still below basal levels ( $15.6 \pm 1.56$ ,  $18.5 \pm 1.90$  and  $22.1 \pm 3.99$ , respectively). However, as Anil and McKinstry (1991) suggested, some symptoms commonly considered relevant for the assessment of consciousness are indicative of brain stem activity only and do not relate to cortical function. The Index of Consciousness assesses cortical activity rather than brain stem activity and the recovery of the brain stem reflexes might precede consciousness.

## 5 CONCLUSIONS

According to the IoC, induction to unconsciousness by the exposure to 70N30C, 80N20C, 85N15C and 90C is not immediate. The onset of unconsciousness, assessed by the decrease of brain activity, occurred from 6 to 9 s earlier when animals were exposed to high concentrations of CO<sub>2</sub> (hypercapnia) compared to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures (hypercapnic hypoxia). Before the loss of consciousness, pigs show signs of breathlessness that were more frequent in 90C than N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures.

When the loss of balance occurred, brain activity remains around basal levels. Muscular excitation during gas stunning might start as aversive response to the atmosphere and be



followed to uncoordinated convulsions in unconscious animals. This muscle excitation delays the calculation of the Index of Consciousness which renders assessment of brain activity during this time difficult.

According to the IoC, brain stem reflexes such as corneal reflex, rhythmic breathing and response to pain could be used as indicators of the onset of brain stem activity recovery but do not necessarily indicate recovery of the cortical activity and therefore consciousness.

At the end of the exposure, pigs exposed to 85N15C recovered the brain stem activity earlier than 90C. In order to avoid recovering, pigs stunned with nitrogen and CO<sub>2</sub> mixtures should be stunned during at least 5 minutes.

## 6 ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (AGL2005 – 06671 – CO2 – 01).

## 7 REFERENCES

- Anil MH, McKinstry JL and Wotton SB (1997) Electrical stunning and slaughter of pigs. Guidelines for good welfare assurance. *Fleischwirtschaft*, 77: 632-635.
- Cardenas K (2008) Analysis of the Update Delay Over Time for Changes in the Index of Consciousness of the IoC-view® Monitor. Morpheus Medical. [http://www.morpheus-medical.com/fileadmin/morpheus\\_files/ioc\\_view/update\\_delay\\_over\\_time.pdf](http://www.morpheus-medical.com/fileadmin/morpheus_files/ioc_view/update_delay_over_time.pdf)
- Accessed March 15, 2012.
- Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the protection of animals at the time of killing. *European Community Official Journal*, L303:1-30.
- Dalmau A, Llonch P, Rodríguez P, Ruíz-de-la-Torre J L, Manteca X and Velarde A (2010a) Stunning pigs with different gas mixtures. Part 1: gas stability. *Animal Welfare*, 19: 315-323.

- Dalmau A, Rodríguez P, Llonch P and Velarde A (2010b) Stunning pigs with different gas mixtures. Part 2: aversion in pigs. *Animal Welfare*, 19: 324-333.
- Dodman NH (1977) Observations on the use of the Wernburg dip-lift carbon dioxide apparatus for pre-slaughter anaesthesia of pigs. *British Veterinary Journal*, 133: 71-80.
- EFSA (2004) Welfare aspects of animal stunning and killing methods. Scientific report of the Scientific Panel for Animal Health and Welfare on a request from the Commission. Retrieved March 15, 2012, from <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/45.htm>
- Ernsting J (1965) The effect of anoxia on the central nervous system. In: A Text Book of Aviation Physiology pp. 271-289. J.A. Gillies (Ed.) Pergamon Press, Oxford, UK.
- Forslid A (1987) Transient neocortical, hippocampal and amygdaloid EEG silence induced by one minute inhalation of high concentration CO<sub>2</sub> in swine. *Acta Physiologica Scandinava* 130: 1-10.
- Forslid A (1992) Muscle spasms during pre-slaughter carbon dioxide anaesthesia in swine. *Fleischwirtschaft*, 72: 167-168.
- Gerritzen MA, Kluivers-Poodt M, Reimert HGM, Hindle V and Lambooij E (2008) Castration of piglets under CO<sub>2</sub>-gas anaesthesia. *Animal* 11: 1666-1673.
- Gregory NG, Moss B and Leeson R (1987) An assessment of carbon dioxide stunning in pigs. *Veterinary Record*, 121: 517-518.
- Gregory NG, Raj ABM, Audsley ARS and Daly CC (1990) Effects of carbon dioxide on man. *Fleishwirtschaft*, 70: 1173-1174.
- Gregory NG 2004. Respiratory system. In: UFAW Animal Welfare Series; Physiology and behaviour of animal suffering pp 207-222. Blackwell Publishing: Oxford, UK.
- Holst S (2002) Behaviour in pigs immersed into atmospheric air or different carbon dioxide concentrations. Danish Meat Research Institute. Internal report Ref.no. 02.709 7295. Unpublished data.
- Huang QF, Gebrewold A, Zhang A, Altura BT, and Altura BM (1994) Role of excitatory amino acid in regulation of rat pial microvasculature. *American Journal of Physiology*, 266: 158-163.

- 
- Llonch P, Andaluz A, Rodríguez P, Dalmau A, Jensen E, Manteca X and Velarde A (2011) Assessment of consciousness during Propofol anaesthesia in pigs. *Veterinary Record*, 169: 496a doi: 10.1136/vr.d5643.
  - Llonch P, Rodríguez P, Gispert M, Dalmau A, Manteca M and Velarde A (2012a) Stunning pigs with nitrogen and carbon dioxide mixtures: effects on animal welfare and meat quality. *Animal* 6: 668-675.
  - Llonch P, Dalmau A, Rodríguez P, Manteca X and Velarde A (2012b) Aversion to nitrogen and carbon dioxide mixtures for stunning pigs. *Animal Welfare*, 21: 33-39.
  - Martoft L, Jensen EW, Rodríguez BE, Jorgensen PF, Forslid A and Pedersen HD (2001) Middle-latency auditory evoked potentials during induction of thiopentone anaesthesia in pigs. *Laboratory Animals*, 35: 353-363.
  - Martoft L, Lomholt L, Kolthoff C, Rodríguez BE, Jensen EW, Jorgensen PF, Pedersen HD and Forslid A (2002) Effects of CO<sub>2</sub> anaesthesia on central nervous system activity in swine. *Laboratory Animals*, 36: 115-126.
  - Raj ABM (1999) Behaviour of pigs exposed to mixtures of gases and the time required to stun and kill them: welfare implications. *Veterinary Record*, 144: 165-168.
  - Raj ABM (2004) Stunning - CO<sub>2</sub> and other gases. In: *Encyclopedia of Meat Science*. Eds: Carrick Devine, Michael Dikeman, Elsevier Science.
  - Raj ABM (2008) Welfare of pigs during stunning and slaughter. In: *Welfare of pigs from birth to slaughter*. L. Faucitano and A.L. Schaefer Eds. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
  - Raj ABM and Gregory NG (1995) Welfare implications of the gas stunning of pigs 1. Determination of aversion to the initial inhalation of carbon dioxide or argon. *Animal Welfare*, 4: 273-280.
  - Raj ABM and Gregory NG (1996) Welfare implications of gas stunning of pigs 2. Stress of induction of anaesthesia. *Animal Welfare*, 5: 71-78.
  - Raj ABM, Johnson SP, Wotton SB and McKinstry JL (1997) Welfare implications of gas stunning pigs 3. The time to loss of somatosensory evoked potentials and spontaneous electroencephalogram of pigs during exposure to gases. *Veterinary Journal*, 153: 329-340.

- Revuelta M, Paniagua P, Campos JM, Fernández JA, Martínez A, Jospin M and Litvan H (2008) Validation of the index of consciousness during sevoflurane and remifentanyl anaesthesia: a comparison with the bispectral index and the cerebral state index. *British Journal of Anaesthesia*, 101: 653-658.
- Rodriguez P, Dalmau A, Ruiz-de-la-Torre JL, Manteca X, Jensen EW, Rodriguez B, Litvan H and Velarde A (2008) Assessment of unconsciousness during carbon dioxide stunning in pigs. *Animal Welfare*, 17: 341-349.
- Silva A, Ferreira DA, Venâncio C, Souza AP and Antunes LM (2011) Performance of electroencephalogram-derived parameters in prediction of depth of anaesthesia in a rabbit model. *British Journal of Anaesthesia*, 106: 540-547.
- Velarde A, Cruz J, Gispert M, Carrión D, Ruiz-de-la-Torre JL, Diestre A and Manteca X (2007) Aversion to carbon dioxide stunning in pigs: effect of the carbon dioxide concentration and the halothane genotype. *Animal Welfare*, 16: 513-522.
- Wotton SB and Gregory NG (1986) Pig slaughtering procedures: time to loss of brain responsiveness after exsanguination or cardiac arrest. *Research in Veterinary Science* 40: 148-151.
- Zeller W, Schatzmann U and Imhof A (1987) *Fleischwirtschaft*, 67: 1519.

**CAPÍTOL 6 / CHAPTER 6**

**Stunning pigs with nitrogen and carbon dioxide mixtures: effects on animal  
welfare and meat quality**

**Chapter based on a paper published in Animal**

**2012 6: 668-675**

---



**ABSTRACT**

The aim of this study was to assess the effect of exposure to the gas mixtures of 70% nitrogen (N<sub>2</sub>) and 30% carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C) on aversion, stunning effectiveness and carcass and meat quality in pigs, and to compare them with the commercial stunning of 90% CO<sub>2</sub> (90C). Sixty eight female pigs were divided into 4 groups and stunned with one of the gas mixtures. During the exposure to the gas, behavioural variables (retreat attempts, escape attempts, gasping, loss of balance, muscular excitation and vocalisations) were recorded, and at the end of the stunning, corneal reflex and rhythmic breathing were assessed. After slaughter, meat quality parameters, such as pH<sub>45</sub> (45min *post mortem*), pH<sub>u</sub> (24h *post mortem*), electrical conductivity, drip loss, and colour, in the *Longissimusthoracis* (LT) and *Semimembranosus* (SM) muscles were measured and the presence of ecchymosis on the hams was noted. PROC MIXED and PROC GENMOD of SAS<sup>®</sup> were used for analyse parametric and binomial variables respectively. The “gas mixture” was always considered a fixed effect and “live weight” as a covariate. To assess the correlation between meat quality and behaviour measures, PROC CORR was used.

Pigs exposed to 90C showed a higher percentage of escape attempts and gasping, a lower percentage of vocalisation and shorter muscular excitation phase than pigs exposed to the other N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> mixtures (P<0.05). After stunning, no pig exposed to 90C showed corneal reflex or rhythmic breathing, whereas 85% and 92% of the animals exposed to N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> mixtures showed corneal reflex and rhythmic breathing, respectively. Animals stunned with 80N20C and 85N15C had a lower pH<sub>45</sub> (P<0.01) than animals exposed to 90C. Electrical conductivity in the SM muscle was lower (P<0.001) in 90C and 70N30C pigs than in 80N20C and 85N15C pigs, whereas in LT it was lower (P<0.05) in 90C pigs than in 85N15C. As the CO<sub>2</sub> concentration of the gas mixture was decreased, the prevalence of exudative pork increased. A 25% of animals exposed to N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> mixtures (N=68) had ecchymosis in their carcasses, whereas no animal stunned with 90C did. In conclusion, although nitrogen and CO<sub>2</sub> stunning exhibits fewer signs of aversion than 90% CO<sub>2</sub>, their induction time to unconsciousness is longer and this may negatively affect meat and carcass quality.





## 1 INTRODUCTION

EU legislation (Council Regulation (EC) No 1099/2009) allows different methods for stunning pigs to minimize anxiety, suffering or pain during slaughter. The most widely used methods are electronarcosis and exposure to high concentrations of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). It has been stated that CO<sub>2</sub> improves meat quality compared to electrical stunning, reducing the incidence of PSE (Pale, Soft and Exudative) meat and ecchymosis in loins and hams (Velarde *et al.*, 2000 and 2001). In CO<sub>2</sub> systems, pigs can be stunned in groups reducing restraining and handling stress (Velarde *et al.*, 2000; EFSA 2004). Nevertheless, CO<sub>2</sub> has some animal welfare disadvantages. The loss of consciousness is not immediate, and during the exposure to the gas, pigs may experience aversion (Raj and Gregory, 1995). Inhalation of CO<sub>2</sub> causes irritation of the nasal mucosa, membranes and lungs (Peppel and Anton, 1993) and induces severe respiratory distress causing hyperventilation and a sense of breathlessness (Gregory *et al.*, 1990).

Exposure to high concentrations of inert gases has also been evaluated for stunning pigs under experimental conditions (Raj and Gregory, 1996; Llonch *et al.*, In press). Inert gases displace O<sub>2</sub> in the atmosphere. A prolonged period of exposure to a hypoxic atmosphere (below 2% of O<sub>2</sub> in atmospheric air) causes a depletion of O<sub>2</sub> levels in blood (hypoxia), provoking a depolarisation of the central nervous system (CNS) (Bager *et al.*, 1992; Raj *et al.*, 1997) and its failure. In contrast to hypercapnia, Raj and Gregory (1996) concluded that stunning with hypoxia, induced by high concentrations of argon, although a longer time of induction was needed and shorter period of unconsciousness was obtained, pigs did not show any sign of aversion. However, due to the negligible presence of argon in the atmosphere (<0.01%) the cost of this gas is prohibitive under commercial conditions. Some studies suggest that hypoxia provoked by the inhalation of high concentrations of nitrogen (N<sub>2</sub>) can obtain results similar to those obtained with argon (Raj *et al.*, 1997; Dalmau *et al.*, 2010b). Due to the elevated concentration of N<sub>2</sub> in the atmosphere (80%) its extraction is easier and cheaper (2.4 times) than that of argon. However, the N<sub>2</sub> relative density (kg/m<sup>3</sup>) is lower than that of air (0.97), which makes difficult its containability into an open well. Dalmau *et al.* (2010a) concluded that mixing N<sub>2</sub> with CO<sub>2</sub> improves its stability and uniformity compared to an atmosphere of saturated concentrations of N<sub>2</sub> (>90%). The mixture of CO<sub>2</sub> with N<sub>2</sub> or

argon in different proportions, leads to hypercapnic hypoxia and causes a quicker depressive effect of the CNS (Raj *et al.*, 1997) compared with anoxia. Raj and Gregory (1995) concluded that the majority of pigs (75%) do not find aversive a gas mixture with up to 30% by volume of CO<sub>2</sub>.

The potential application of hypercapnic hypoxia stunning in commercial conditions will depend also on its effects on meat and carcass quality. It is well known that meat quality is strongly influenced by behavioural and physiological response of the animals before slaughter (Cannon *et al.*, 1996). Increased physical activity and stress immediately before slaughter is associated with the presence of PSE meat (Monin, 1988; D'Souza *et al.*, 1999; Terlouw, 2005). Taking into consideration the suggestions of Raj *et al.* (1995) that the majority of pigs do not show aversion to the presence of 30% CO<sub>2</sub> in air, gas mixtures of N<sub>2</sub> with up to 30% CO<sub>2</sub> (hypercapnic hypoxia) would induce less aversion than 90% CO<sub>2</sub> (hypercapnia) and consequently could improve meat quality compared to high concentrations of CO<sub>2</sub>. The aim of this study was to assess the effect of stunning with 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C) on aversion, stunning effectiveness and meat and carcass quality compared with 90% of CO<sub>2</sub> (90C).

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Animals

The study consisted on two trials of 34 commercial crossbreed female pigs, with a live weight of 92.6±1.19 kg. The second trial was carried out one week later than the first one. Each trial was carried out during two slaughter days with an interval of 2 days. The animals were selected from a commercial farm and transported to the IRTA facilities 3 days before the first slaughter day of each trial. Upon arrival to the facilities, pigs were divided into four groups of 8 or 9 pigs, and housed in pens of 18.2 m<sup>2</sup> (8.3 x 2.2). Animals were fed *ad libitum* with the same feed used on the farm of origin until 12 hours before being slaughtered, when all animals were fasted. Water was continuously available. Each group was assigned randomly to one of the four treatments.

### 2.2 Facilities

The experiment was carried out at the experimental slaughterhouse of IRTA-Monells, next to the housing pens, and equipped with a CO<sub>2</sub> Dip Lift stunning unit (Butina, Alps,

Copenhagen). This system consisted of a crate that descended into a well of 260 cm depth and 8 m<sup>3</sup> of volume. The CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> concentrations were controlled and mixed with two flowmeters (R-300-G Inox, Maquinsa, Madrid, Spain) at three bars of pressure and a flow rate of 16 Nm<sup>3</sup>/h (Dalmau *et al.*, 2010a). The concentration of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> were monitored at 120 cm depth with a portable infrared and electrochemical sensor, respectively (Map Check Combi O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, PBI-Dansensor, Barcelona, Spain). The housing pens were connected to the stunning unit by a straight corridor of 412 cm length and 60 cm wide. The corridor was bounded by stainless steel plates of 90 cm height which prevented the pigs from seeing outside the corridor and turning back. The crate was

### 2.3 Slaughter procedure

Each treatment group was stunned with one of the following gas mixtures: 90% CO<sub>2</sub> (90C or control), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C), all with less than 2% O<sub>2</sub> by volume in atmospheric air. On each slaughter day two different treatments were carried out. In trial 1, the treatments of the first day were 90C and 85N15C whereas in the second trial they were 80N20C and 70N30C. After each treatment, the stunning system was emptied and refilled with the next gas mixture. Within each group, pigs were randomly chosen and subsequently weighed. Afterwards they were placed at the beginning of the corridor and allowed to enter voluntarily to the stunning crate. If after 30 s the pig had not entered the crate, using a rattle paddle from behind, they were gently pushed inside. Afterwards, the crate was descended to the bottom of the well for 23 s, remained stationary during 223 s and ascended to the surface (23 s), so the total cycle of exposure was 270 s. After being shackled, the pig was bled out by means of an incision of the brachiocephalic trunk 35 s after the end of the exposure. Then, the pig was scalded and eviscerated and, after splitting, carcasses were kept in a conventional chilling room at 2-3 °C overnight.

### 2.4 Behaviour measurements

Handling in the raceway was scored as 0 if the pig entered the crate voluntarily or 1 if the animal required a gentle pushing into the crate. The behaviour of the animal in the stunning system was recorded with a videocàmera (Sony Colour CCD AVC 565, Circontrol, Barcelona, Spain) placed on the roof of the crate and connected to a digital image recorder (VDVR-4S 550430, Circontrol, Barcelona, Spain). The video records

were subsequently analyzed using behaviour analysis software (Observer XT 9, Noldus, Wageningen, The Netherlands). The presence or absence of the following behaviours inside the crate and its latency were assessed to determine aversion:

- Retreat attempts: Pigs backing away (Velarde *et al.*, 2007).
- Escape attempts: Pigs raising their forelegs on the side of the crate either prior to or when losing balance (Raj and Gregory, 1996).
- Vocalizations: shouts or snores emitted by the animal during the induction to unconsciousness (EFSA, 2004; Rodríguez *et al.*, 2008). Only the vocalizations emitted before losing balance were considered as a sign of aversion and therefore recorded.
- Gasping: A very deep breath through a wide open mouth, which may involve stretching of the neck. It is considered an indicator of onset of breathlessness (Velarde *et al.*, 2007).

The onset and duration of the muscle excitation phase, defined as muscular contractions similar to spasms or convulsions (Forslid, 1987) of the whole body or part of it, and the time to loss of balance, defined by the inability of the animal to remain in a standing position and considered the first indicator of onset of unconsciousness (Raj and Gregory, 1996), were also recorded. All recording times were synchronized with the beginning of the descent into the well.

After the stunning procedure, right after the exit from the stunner, the loss of sensibility was assessed through the absence of brain stem reflexes such as rhythmic breathing (by visual inspection of the thoracic ventilation) and corneal reflex (by touching the cornea with a blunt object) on the left side at 10 s interval until 2 minutes.

### **2.5 Carcass and meat quality measurements**

After slaughter, each carcass was weighted individually. Meat quality measurements were performed on the *Longissimusthoracis* (LT), at the level of the last rib, and *Semimembranosus*(SM) muscles at the left side of the carcass. Muscle pH at 45 min (pH45) and at 24 h *post mortem* (pHu) was measured with a portable pH-meter (Knick, Berlin, Germany) equipped with a Xerolyt electrode. Electrical conductivity at 24h *post mortem* (ECu) was measured at the last rib level using a Pork Quality Meter (PQM-I, INTEK Aichach, Germany).

Muscle samples of  $88.1 \pm 14.2$  g (mean $\pm$ sd) from the LT muscle were collected at 24 h *post mortem*, at the 3/4 last rib level in cranial direction, to measure drip loss and meat colour. Drip loss was determined by reweighting 48 h after sampling, following the reference method of OECD (Honikel, 1996). Colour was measured, after a blooming time of 5 min, using a spectrophotometer (Minolta CR-400) and determined using the CIELab L\* (lightness) a\* (redness) b\* (yellowness) colour space (CIE, 1976). A subjective colour score was given by two trained observers using the Japanese Scale Colour (JSC) (Nakai, 1975).

SM muscles showing  $\text{pH}_{45} \leq 6.00$  and  $\text{DRIP} < 6$  and  $\text{CIE L}^* > 50$  were classified as PSE whereas samples showing  $\text{pH}_{45} \leq 6.00$  and  $\text{DRIP} < 6$  but the meat colour was not altered ( $\text{CIE L}^* = 44-50$ ) (Faucitano *et al.*, 2010) were classified as RSE. Those samples presenting  $\text{pHu} \geq 6.00$  and  $\text{DRIP} < 3.0$  and  $\text{CIE L}^* < 44$ , were classified as DFD (Faucitano *et al.*, 2010). Presence of ecchymosis, defined as blood areas greater than 1 cm and darker in colour located in the hams (Velarde *et al.*, 2000) was also recorded.

## 2.6 Statistical analysis

Data were analyzed with the Statistical Analysis System (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1999-2001). Latency measures such as time of the first retreat attempt, escape attempt, gasping, loss of balance, vocalization and muscle excitation as well as meat quality parametric measures, such as  $\text{pH}_{45}$ ,  $\text{pHu}$ , drip loss,  $\text{ECu}$ ,  $\text{L}^*$ ,  $\text{a}^*$  and  $\text{b}^*$  were analysed with a mixed model analysis of variance (PROC MIXED) with the “gas mixture” as fixed effect and “live weight” as a covariate. The “animal” and “day” were included as random effects in the model. When the analysis of variance showed significant differences ( $P < 0.05$ ) a least square means comparison test (LSMEANS) adjusted to multiple comparison test of Tukey was carried out.

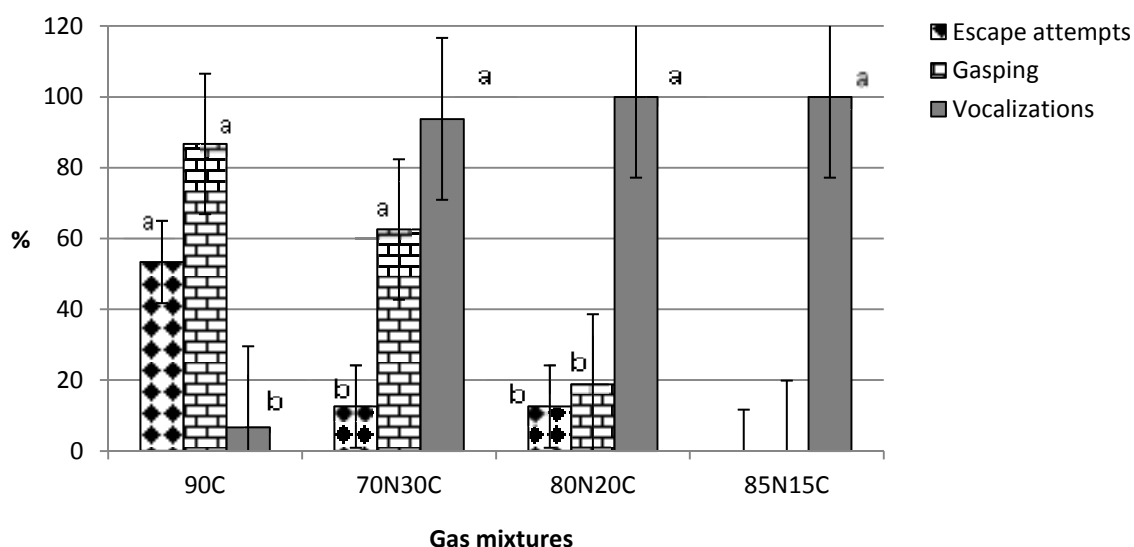
The binomial variables (handling in the raceway, presence of retreat attempts, escape attempts, loss of balance, gasping, vocalization, muscular excitation, RSE meat, ecchymosis, corneal reflex and rhythmic breathing) were analyzed using a generalized linear model analysis of variance (PROC GENMOD) following a binomial distribution. The JSC was analysed using a PROC GENMOD with a multinomial distribution. The fixed effects considered were “gas treatment”, “time to loss balance” and “duration of muscular excitation” and “live weight” was included as a covariate. When significant effects ( $P < 0.05$ ) were found in any meat and carcass quality measure, the correlation

(PROC CORR) between the different measures of behaviour and quality was also analyzed. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of IRTA.

### 3 RESULTS

#### 3.1 Aversion

The percentages of pigs showing escape attempts, gasping and vocalisations are presented in Figure 1. No differences between treatment groups were seen in the percentage of animals that needed to be pushed into the crate (75.0, 75.0, 81.0 and 60.0% for 85N, 80N 70N and 90C, respectively) and showed retreat attempts (88.0, 94.0, 69.0 and 93.0% for 85N, 80N 70N and 90C, respectively) or in the time to perform it ( $5.5 \pm 0.58$  s). The percentage of animals that attempted to escape was higher ( $P < 0.001$ ) when exposed to 90C than when exposed to  $N_2/CO_2$  gas mixtures. The percentage of animals that gasped was higher in 90C and 70N30C than in 80N20C pigs ( $P < 0.001$ ). No pig exposed to 85N15C performed gasping.



**Figure 1. Percentage (%) of pigs that showed escape attempts, gasping and vocalisations during the exposure to 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).**

Percentages with different superscripts letters are significantly different ( $p < 0.001$ ) among gas mixtures.

The onset of gasping and muscular excitation is showed in Table 1. Gasping occurred earlier in 90C than 70N30C and 80N20C animals ( $P<0.01$  and  $P<0.05$ , respectively). On the other hand, focusing on the vocalisations that occurred before the loss of balance, any animal exposed to 90C performed vocalisations whereas a 19.0% (85N15C), 13.0% (80N20C) and 13.0% (70N30C) did.

The time to loss balance ( $28.1\pm 0.59$  s) and the onset of muscular excitation ( $31.2\pm 0.73$  s) were not different between treatments. Pigs exposed to 70N30C and 80N20C exhibited a longer ( $P<0.05$ ) duration of muscular excitation than 90C pigs (Table 1).

**Table 1. Mean and standard error of the time (s) to perform gasping, duration of the muscular excitation during the exposure to 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).**

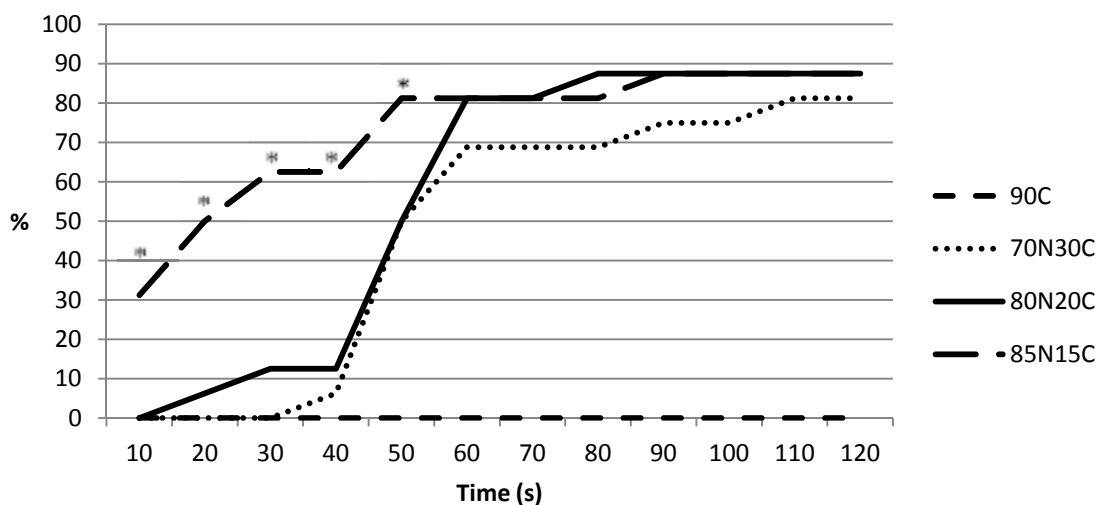
	Gas mixtures				
	90C	70N30C	80N20C	85N15C	Significance
Gasping	24.1±0.90 <sup>b</sup>	29.9±1.07 <sup>a</sup>	30.7±3.93 <sup>a</sup>	-	**
Duration of muscular excitation	15.1±1.99 <sup>b</sup>	20.6±1.49 <sup>a</sup>	20.3±1.32 <sup>a</sup>	19.4±1.23 <sup>ab</sup>	*

Means with different superscripts letters are significantly different among gas mixtures. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ .

### 3.2 Loss of sensibility

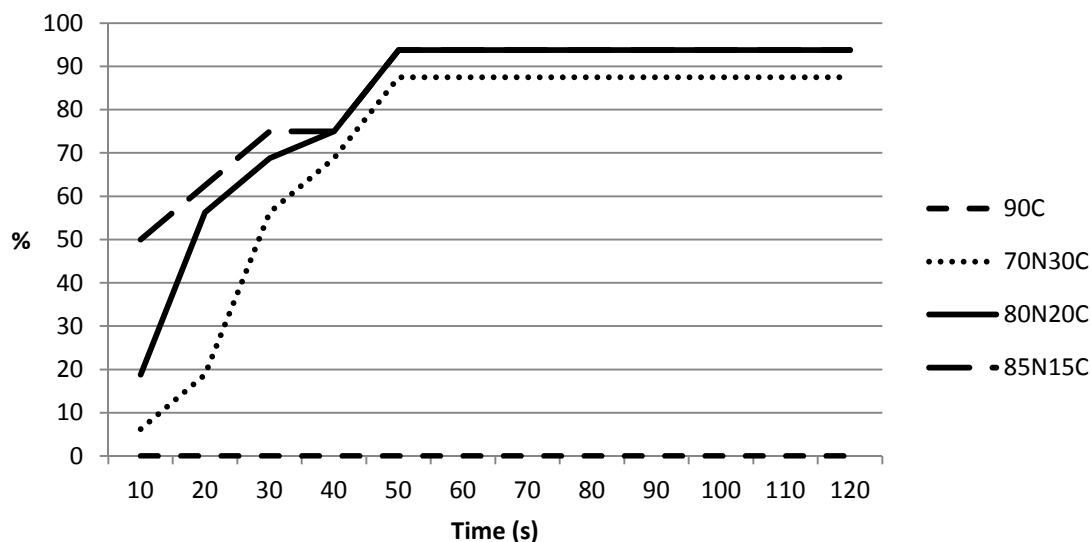
The percentages of pigs showing corneal reflex and rhythmic breathing are shown in Figure 2 and 3, respectively. Immediately after the end of the exposure, any animal showed neither corneal reflex nor rhythmic breathing. Before sticking, the corneal reflex remained absent in 70N30C and 90C. Lower ( $P<0.01$ ) percentage of pigs stunned with 80N20C recovered corneal reflex compared to 85N15C pigs (14% vs. 71%, respectively). A 72% of animals stunned with nitrogen mixtures recovered rhythmic breathing before sticking, but there was no difference between treatments. Afterwards,

91.8% and 85.7% of the pigs exposed to nitrogen mixtures recovered rhythmic breathing and corneal reflex before death, respectively.



**Figure 2. Cumulative percentage (%) of pigs that performed corneal reflex after the end of exposure to 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).**

The presence of an asterisk means percentages significantly ( $P < 0.05$ ) different between treatments.



**Figure 3. Cumulative percentage (%) of pigs that performed rhythmic breathing after the end of exposure to 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).**



There was no difference in the time to perform rhythmic breathing recovery among treatments. In addition, the corneal reflex appeared earlier in 85N15C than in 80N20C and 70N30C pigs ( $P<0.01$  and  $P<0.001$  respectively) as it is shown in Table 2.

**Table 2. Mean and standard error of the time (s) to perform corneal reflex and rhythmic after exposure to 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).**

	Gas mixtures				Significance
	90C	70N30C	80N20C	85N15C	
Corneal reflex	-	56.8±5.36 <sup>a</sup>	50.7±3.63 <sup>a</sup>	25.4±6.28 <sup>b</sup>	$P<0.01$
Rhythmic breathing	-	29.7±3.47	24.0±3.94	17.7±4.10	NS

### 3.3 Carcass and meat quality

Least square means and standard errors of meat quality traits are shown in Table 3. The pH<sub>45SM</sub> and pH<sub>45LT</sub> were lower in animals stunned with 80N20C and 85N15C than in those stunned with 90C ( $P<0.001$  and  $P<0.01$ , respectively). Although aversion signs observed during gas exposure do not appear to have an impact on meat quality variation, a negative correlation was found between the duration of the muscular excitation and both the pH<sub>45SM</sub> ( $r=0.39$ ;  $P=0.001$ ) and the pH<sub>45LT</sub> ( $r=0.42$ ;  $P<0.001$ ).

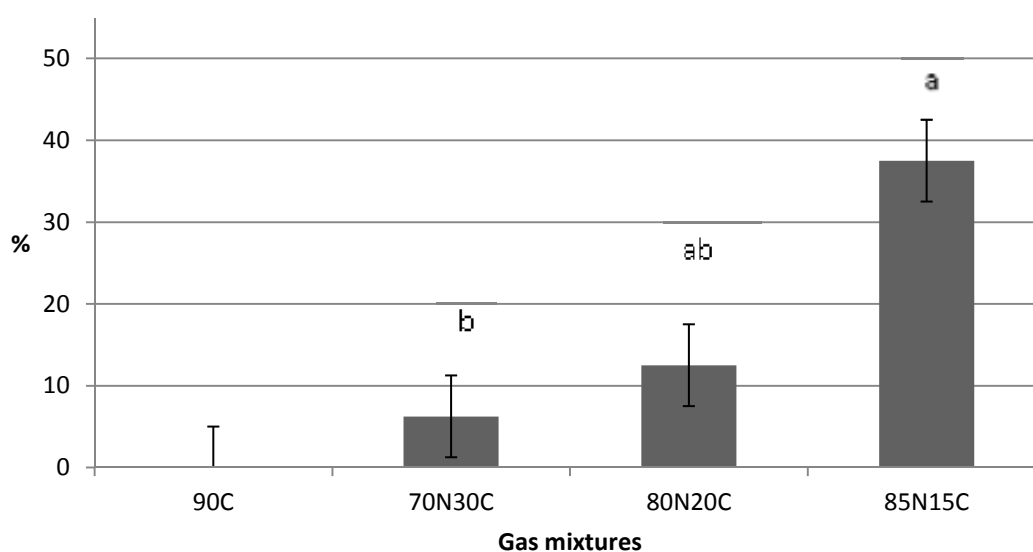
**Table 3. Mean and standard error of the meat quality measurements in *Semimembranosus* (SM) and *Longissimus thoracis* (LT) in pigs stunned with 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).**

		Gas mixtures				
Measures		90C	70N30C	80N20C	85N15C	Significance
pH45 (SM)		6.6±0.05 <sup>a</sup>	6.4±0.05 <sup>ab</sup>	6.2±0.06 <sup>b</sup>	6.2±0.07 <sup>b</sup>	***
pH45 (LT)		6.6±0.06 <sup>a</sup>	6.4±0.05 <sup>ab</sup>	6.3±0.06 <sup>b</sup>	6.2±0.07 <sup>b</sup>	**
pHu (LT)		5.5±0.03 <sup>a</sup>	5.5±0.03 <sup>ab</sup>	5.4±0.01 <sup>b</sup>	5.4±0.01 <sup>b</sup>	**
Electrical conductivity (ms)	SM muscle	5.3±0.42 <sup>b</sup>	5.8±0.54 <sup>b</sup>	9.1±0.58 <sup>a</sup>	9.3±0.57 <sup>a</sup>	***
Electrical conductivity (ms)	LT muscle	4.9±0.23 <sup>b</sup>	5.0±0.36 <sup>ab</sup>	6.0±0.44 <sup>ab</sup>	6.7±0.65 <sup>a</sup>	*
Drip Loss		4.8±0.32 <sup>b</sup>	5.9±0.46 <sup>ab</sup>	5.8±0.42 <sup>ab</sup>	6.3±0.48 <sup>a</sup>	*
Colour (JSC)		2.8±0.14	2.7±0.14	2.8±0.09	2.7±0.14	NS
Colour CIELab	a*	6.4±0.24	6.6±0.23	6.8±0.20	6.6±0.20	NS
	b*	1.6±0.30	2.0±0.29	1.7±0.25	1.5±0.21	NS
	L*	47.7±0.90	49.5±0.84	48.8±0.63	48.9±0.78	NS

Means with different superscripts letters are significantly different among gas mixtures.

\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

A percentage of carcasses were classified as RSE (Figure 4), which was affected by treatment ( $P<0.05$ ). Any carcass showed PSE meat. Despite the fact that pHu in LT was higher ( $P<0.01$ ) in 90C than in 80N20C and 85N15C pigs, DFD meat was not found in any of the treatments. ECu of SM muscle was higher ( $P<0.001$ ) in animals exposed to 80N20C and 85N15C than in those exposed to 70N30C and 90C. On the other hand, ECu in the LT muscle was higher ( $P<0.05$ ) in 85N15C than in 90C pigs. The correlations ( $r$ ) between pH45 and ECu were -0.6 and -0.5 in SM and LT muscle, respectively ( $P<0.001$ ). Drip loss tended to be higher ( $P=0.086$ ) in 85N15C ( $6.3\pm 0.48$ ) than in 90C pigs ( $4.8\pm 0.32$ ). Subjective (JSC) and objective ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) colour measurements were not significantly different between gas treatments. The percentage of carcasses with ecchymosis in hams was not different among the nitrogen and CO<sub>2</sub> gas mixtures (25.5%) but it was significantly lower ( $P<0.001$ ) in animals stunned with 90C (0%).



**Figure 4. Percentage (%) of carcasses with RSE meat in pigs stunned with 90% CO<sub>2</sub> (90C), 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), 80% N<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) and 85% N<sub>2</sub> and 15% CO<sub>2</sub> (85N15C).**

Percentages with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ) among gas mixtures.

## 4 DISCUSSION

### 4.1 Animal welfare

Retreat attempt is the first reaction of pigs when they are exposed to an unpleasant situation (Dodman, 1977). Holst (2002) reported a more than a double proportion (49%) of pigs backing-away when exposed to 90% CO<sub>2</sub> than when exposed to atmospheric air (21%). Llonch *et al.* (In Press) descended pigs into a pit full of CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> gas mixtures after being trained in atmospheric air and suggested that the inhalation of these mixtures is more aversive than the inhalation of atmospheric air. In our study, the percentages of animals that showed retreat attempts during exposure to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixtures and 90C were similar. However, there is a lack of information on the magnitude of this response caused by the descending movement (Raj and Gregory, 1996; EFSA, 2004) or by the inhalation of the gas mixtures. Thus, in cases in which the animals would not have been previously trained to be descended into a pit, retreat attempts might not be a good indicator of aversion to gas inhalation.

In our study, pigs exposed to 90C showed a higher percentage of escape attempts and gasping than pigs exposed to the N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures. This aversive behaviour could be due either to the irritation of the mucosa or to the sense of breathlessness when this gas was inhaled. In this sense, the lower CO<sub>2</sub> concentration of the gas mixtures might reduce the irritation of the mucosa and the sense of breathlessness, resulting in a lower aversion during the exposure. Although gasping is not an expression of aversion, it is considered a physiological reaction associated with breathlessness during the inhalation of high concentrations of CO<sub>2</sub> (Raj and Gregory, 1996). It is due to residual medullary activity in the brainstem when it becomes hypercapnic (Gregory, 2004), and increases with higher CO<sub>2</sub> concentration. Raj and Gregory (1996) suggested that with concentrations up to 30% CO<sub>2</sub> in a hypoxic atmosphere, the sense of breathlessness is moderate. However, in our study, based on the percentage of animals gasping, the sense of breathlessness was significantly lower when pigs were exposed to concentrations up to 20% CO<sub>2</sub>. Additionally, it has to be noted that using 85N15C, no animal showed escape attempts or gasping. It is likely that, as previously hypothesised, the sense of breathlessness might be related to escape attempts and thus, the lower aversive behaviour will be found in the gas mixtures with a lowest concentration of CO<sub>2</sub>.

When exposed to 90C, none of the pigs vocalised during the induction to unconsciousness as shown by previous studies (Dodman, 1977; Ring and Schlager, 1988; Holst, 2002). On the other hand, between 12 and 19% of the pigs exposed to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures vocalized before the loss of balance. Raj (1999) reported that Sensibility Evoked Potentials (SEP) recorded during exposure to argon-induced hypercapnic hypoxia disappeared before the onset of vocalisations. Therefore, it is not clear if under our experimental conditions vocalisations occurred when pigs were still conscious or not. Furthermore, it is hard to explain the presence of signs of aversion in nitrogen-stunned pigs only. It may be assumed that the potential pain caused by the irritation of the mucosa might prevent pigs from vocalizing.

The time to lose balance is considered the first behavioural indicator of the onset of unconsciousness (Raj and Gregory, 1996). When pigs are stunned with inert gases the time to lose balance increases compared to pigs stunned with 90C, but when a concentration of up to 30% CO<sub>2</sub> is added to the inert gas, the time to lose balance decreases to values similar to those seen with 80% CO<sub>2</sub> (Raj and Gregory, 1996). Although both anoxia and hypercapnia cause a loss of consciousness, the mechanism is different. Inhalation of high concentrations of CO<sub>2</sub> decreases the Cerebral Spinal Fluid (CSF) pH, leading to inhibition of the cortical function (Rodríguez *et al.*, 2008), whereas brain hypoxia causes the inhibition of the reticular formation (EFSA, 2004) and results in an accumulation of extra-cellular potassium and a metabolic crisis which, if long enough, leads to neuronal death (Rosen and Morris, 1991). The acidification of the CSF induces a quicker unconsciousness than hypoxia. However, the longer time to inhibit the CNS by hypoxia is enhanced by the addition of low concentrations of CO<sub>2</sub> (<30% CO<sub>2</sub>).

Treatments applied in this study, muscular excitation started between 2 to 4 s. after the loss of balance. Some authors suggest that muscular excitation is caused by convulsions that result from the lack of modulation of the caudal reticular formation from higher centres, particularly the cerebral cortex and the rostral reticular formation (Dell *et al.*, 1961; Ernsting, 1965; EFSA, 2004). However, Rodriguez *et al.* (2008) exposed pigs to 90% CO<sub>2</sub> and suggested that muscular excitation occurs before significant changes were shown in the brain function, which could indicate that pigs are conscious during this period. With the results of the present study, it cannot be concluded whether muscular

excitation in hypercapnic hypoxia inhalation occurred when the pigs were already unconscious and consequently, if it could be taken as a sign of aversion. As previously mentioned, muscular excitation is enhanced by the lack of modulation during hypoxia, which in turn, is inhibited by the acidification of the CSF due to the inhalation of CO<sub>2</sub>. Thus, as already suggested by Raj (1999), the higher the concentration of CO<sub>2</sub>, the shorter the duration of muscular excitation.

The absence or presence of different easy reliable clinical brainstem reflexes (corneal reflex and rhythmic breathing) can be used to assess unconsciousness after carbon dioxide stunning (Holst, 2001). In our experiment, all animals were unconscious by the end of the exposure, with absence of both physiological reflexes. However, according to the percentage of animals that recovered corneal reflex and rhythmic breathing, the period of unconsciousness after exposure to 90C lasted until brain death due to exsanguination, whereas the majority of animals stunned with nitrogen mixtures recovered rhythmic breathing before sticking and the majority of 85N15C pigs recovered corneal reflex as well. It is likely that the acidification of the CFS induces a longer period of unconsciousness than N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixtures. However, due to a more pronounced acidification effect of the 90C exposure compared with N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixtures, the reversibility of the metabolic disorders in hypercapnia may persist longer and the return to consciousness can be delayed compared to 70N30C, 80N20C and 85N15C treatments. Actually, based on the percentage of pigs that recovered rhythmic breathing, 85N15C is the gas mixture that causes the shortest period of unconsciousness of all treatments. In brief, a higher CO<sub>2</sub> concentration increases the duration of the unconsciousness (EFSA, 2004) during N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixtures stunning. Thus, in order to guarantee the unconsciousness of the animals until brain death when exposed to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas mixtures, either longer time of exposure or additional methods to maintain brain inactivity are needed, as already stated by Raj (1999).

### **4.2 Carcass and meat quality**

Several studies have concluded that the stunning method has a large impact on blood splashes and bone fractures, and meat quality (Velarde *et al.*, 2000 and 2001; Troeger *et al.*, 2005). Increased physical activity or stress immediately before slaughter is associated with a faster pH decline in meat due to increased ATPase activity and lactate accumulation in the muscle (Monin, 1988; D'Souza *et al.*, 1999; Terlouw, 2005). Our

hypothesis that aversion to gas mixture exposure during stunning could lead to an increase of the stress immediately before slaughter and consequently have a negative impact on meat quality has not been supported by the results obtained of this study. In fact, although aversion occurred several seconds after the beginning of the exposure until the loss of balance (approximately 28 s), the stress response at this time might have been too weak to cause metabolic changes at the muscle level, resulting in poor meat quality.

Troeger *et al.* (2005) showed that pigs stunned with mixtures of argon and CO<sub>2</sub> with low concentrations of O<sub>2</sub> had a longer and more intense muscle excitation phase compared to pigs exposed to high concentrations of either argon or CO<sub>2</sub>, which provokes an acceleration of the muscle glycolytic process at post-mortem time. Van der Wal, (1997) suggested that muscular contractions during and after stunning had a negative effect on pork quality, causing a more rapid drop in pH and a reduced water holding capacity due to increased *post-mortem* protein denaturation (Warris and Brown, 1987). According to our results, animals stunned with 80N20C and 85N15C showed a longer muscular excitation and had a lower pH<sub>45</sub> than the other experimental groups, suggesting that there was a negative correlation between duration of muscular excitation and pH<sub>45</sub>. An increase in the rate of *post-mortem* pH fall increases the incidence of PSE meat (Troeger and Waltersdorf, 1991). For instance, in our study no PSE pork was found but the higher prevalence of RSE meat, which is considered a milder form of PSE pork (Faucitano *et al.*, 2010), was found in animals stunned with 85N15C followed by 80N20C and 70N30C animals. In conclusion, the 90C treatment reduces muscular excitation compared to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixtures leading to a lower incidence of RSE meat.

The presence of ecchymosis in the ham was also affected by the duration of muscular excitation. In fact, increased muscular excitation during exposure to N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixtures caused a higher incidence of ecchymosis compared to 90C. Troeger *et al.* (2005) suggested that the low concentration of residual oxygen in the atmosphere also contributes to the occurrence of ecchymosis in the carcasses of pigs stunned with hypoxia. The lack of oxygen in the blood vessels induces the release of catecholamines (Machold *et al.*, 2003) and causes vasodilation (Wadsworth, 1994), resulting in increased blood supply and pressure. In our study, the range of O<sub>2</sub> concentration in the gas mixtures (from 1% to 2% of volume in atmospheric air) did not show significant

differences between groups and consequently the differences in the incidence of ecchymosis may not be caused by differences in O<sub>2</sub> concentrations. Thus, besides vasodilatation, ecchymosis may have occurred due to the rupture of muscle capillaries induced by the vigorous muscular contraction. This hypothesis can be validated by the superficial location of blood splashes since the blood vessels on the surface are easier to tear due to muscle contraction and blood pressure rise compared to those located inside the muscle Troeger *et al.* (2005). However, this effect was not homogenous around the arteries of the surface where some capillaries were torn when pressure increased.

## 5 CONCLUSIONS

According to our results, stunning pigs by exposure to high concentration of CO<sub>2</sub> (90C) leads to a higher aversion and breathlessness than 70N30C, 80N20C and 85N15C gas mixtures.

Loss of consciousness determined by the loss of balance is similar among the gas mixtures assessed. However, the time of unconsciousness is reduced with nitrogen gas mixtures with up to 30% CO<sub>2</sub> compared to 90C when the same time of exposure is used.

Exposure to N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> mixtures increases the duration of muscular contractions which leads to a quicker drop of the early post-mortem pH and consequently to a higher incidence of exudative pork and blood splashes.

In order to consider the nitrogen and CO<sub>2</sub> mixtures as a good alternative to CO<sub>2</sub> stunning in pigs, it should be taken into account the benefits on animal welfare in relation to the effects on meat and carcass quality.

## 6 ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (AGL2005 – 06671 – CO2 – 01). Thanks are due to Miss M<sup>a</sup> José Bautista, Mr Albert Rosell and Mr Agustí Quintana for their technical support during the study.

## 7 REFERENCES

- Bager F, Braggins TJ, Devine CE, Graafhuis AE, Mellor DJ, Tavener A and Upsdell MP (1992) Onset of insensibility at slaughter in calves: effects of electroplectic



- seizure and exsanguination on spontaneous electrocortical activity and indices of cerebral metabolism. *Research in Veterinary Science*, 52: 162-173.
- Cannon JE, Morgan JB, McKeith FK, Smith GC, Sonka S, Heavner J and Meeker DL (1996) Pork chain quality audit survey: quantification of pork quality characteristics. *Journal of Muscle Foods*, 7: 29-44.
  - CIE (1976) Commission Internationale de l'Éclairage. Colorimetry. Vienna, Austria, Bureau Central de la CIE. Publication no. 15.
  - Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the protection of animals at the time of killing. European Community Official Journal L303, 1-30.
  - Dalmau A, Llonch P, Rodríguez P, Ruíz-de-la-Torre J L, Manteca X and Velarde A (2010<sup>a</sup>) Stunning pigs with different gas mixtures. Part 1: gas stability. *Animal Welfare*, 19: 315-323.
  - Dalmau A, Rodríguez P, Llonch P and Velarde A (2010<sup>b</sup>). Stunning pigs with different gas mixtures. Part 2: aversion in pigs. *Animal Welfare*, 19: 324-333.
  - Dell P, Hugelin A and Bonvallet M (1961) Cerebral Anoxia and the Electroencephalogram. H. Gustaut and JS. Meyer (Eds.): Charles C Thomas. Springfield, Illinois, USA.
  - Dodman NH (1977) Observations on the use of the Wernburg dip-lift carbon dioxide apparatus for pre-slaughter anaesthesia of pigs. *British Veterinary Journal*, 133: 71-80.
  - D'Souza DN, Dunshea FR, Warner RD and Leury BJ (1999) Comparison of different dietary magnesium supplements on pork quality. *Meat Science*, 51: 221-225.
  - EFSA (2004) Welfare aspects of animal stunning and killing methods. Scientific report of the Scientific Panel for Animal Health and Welfare on a request from the Commission. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/45.htm>. Accessed March 14th 2012.
  - Ernsting J (1965) The effect of anoxia on the central nervous system. In: A Text Book of Aviation Physiology. J.A. Gillies (Ed.) Pergamon Press, Oxford, UK.
  - Faucitano L, Ielo MC, Ster C, Lo Fiego DP, Methot S and Saucier L (2010) Shelf life of pork from five different quality classes. *Meat Science*, 84: 466-469.

- Forslid A (1987) Transient neocortical, hippocampal and amygdaloid EEG silence induced by one minute inhalation of high concentration CO<sub>2</sub> in swine. *Acta Physiologica Scandinava*, 130: 1-10.
- Gregory NG (2004) Respiratory system. In: Physiology and behaviour of animal suffering, UFAW Animal Welfare Series. Blackwell Publishing: Oxford, UK.
- Gregory NG, Raj ABM, Audsley ARS and Daly CC (1990) Effects of carbon dioxide on man. *Fleishwirtschaft*, 70: 1173-1174.
- Holst S (2001) Carbon dioxide Stunning of Pigs for Slaughter- Practical Guidelines for Good Animal Welfare. Proceeding of 47th International Congress of Meat Science and Technology, Krakow, Poland.
- Holst S (2002) Behaviour in pigs immersed into atmospheric air or different carbon dioxide concentrations. Danish Meat Research Institute. Internal report Ref.no. 02.7097295. Unpublished data.
- Honikel KO (1996) Reference methods supported by OECD and their use in Mediterranean meat products. *Food Chemistry*, 54: 573-582.
- Llonch P, Dalmau A, Rodríguez P, Manteca X and Velarde A Aversion to nitrogen and carbon dioxide mixtures for stunning pigs. *Animal Welfare* (In press)
- Machold U, Troeger K and Moje M (2003) Gas stunning of pigs - A comparison of carbon dioxide, argon, a nitrogen-argon-mixture and argon/carbon dioxide, (2 steps-system) under animal welfare aspects. *Fleischwirtschaft*, 83: 109-114.
- Monin G (1988) Stress d'abattage et qualités de la viande. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 164 : 835-842.
- Nakai H, Saito F, Ikeda T, Ando S and Komatsu A (1975) Standard models of pork colour. *Bulletin National Institution Animal Industry*, 29: 69-74.
- Poppel P and Anton F (1993) Responses of rat medullary dorsal horn neurons following intranasal noxious chemical stimulation: effects of stimulus, intensity, duration, and interstimulus interval. *Journal of Neurophysiology*, 70: 2260-2274.
- Raj ABM (1999) Behaviour of pigs exposed to mixtures of gases and the time required to stun and kill them: welfare implications. *Veterinary Record*, 144: 165-168.
- Raj ABM and Gregory NG (1995) Welfare implications of the gas stunning of pigs 1. Determination of aversion to the initial inhalation of carbon dioxide or argon. *Animal Welfare*, 4: 273-280.

- Raj ABM and Gregory NG (1996) Welfare implications of gas stunning of pigs 2. Stress of induction of anaesthesia. *Animal Welfare*, 5: 71-78.
- Raj ABM, Johnson SP, Wotton SB and McKinstry JL (1997) Welfare implications of gas stunning pigs 3. The time to loss of somatosensory evoked potentials and spontaneous electroencephalogram of pigs during exposure to gases. *Veterinary Journal* 153: 329-340.
- Ring C and Schlager B (1988) Quality of the meat of CO<sub>2</sub>-stunned pigs. *Fleischwirtschaft*, 68: 1532-1534.
- Rodriguez P, Dalmau A, Ruiz-de-la-Torre JL, Manteca X, Jensen EW, Rodriguez B, Litvan H and Velarde A (2008) Assessment of unconsciousness during carbon dioxide stunning in pigs. *Animal Welfare*, 17: 341-349.
- Rosen AS and Morris ME (1991) Depolarising effects of anoxia on pyramidal cells of rat neocortex. *Neuroscience Letters*, 124: 169-173.
- Terlouw C (2005) Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience. A brief review of recent findings. *Livestock Production Science*, 94: 125-135.
- Troeger K and Woltersdorf W (1991) Gas anaesthesia of slaughter pigs. Stunning experiments under laboratory conditions with fat pigs of known halothane reaction type: meat quality and animal protection. *Fleischwirtschaft*, 71: 1063-1068.
- Troeger K, Machold U, Moje M and Behrschmidt M (2005) Gas stunning of pigs. A comparison of carbon dioxide, argon, a nitrogen/argon mixture and argon/carbon dioxide under meat quality aspects. 3. Summary and discussion of results; conclusions. *Fleischwirtschaft*, 5: 109-111.
- Velarde A, Gispert M, Faucitano L, Manteca X, Diestre A (2000) The effect of stunning method on the incidence of PSE meat and haemorrhages in pork carcasses. *Meat Science*, 55: 309-314.
- Velarde A, Gispert M, Faucitano L, Alonso P, Manteca X and Diestre A (2001) Effects of the stunning procedure and the halothane genotype on meat quality and incidence of haemorrhages in pigs. *Meat Science*, 58: 313-319.
- Velarde A, Cruz J, Gispert M, Carrión D, Ruiz-de-la-Torre JL, Diestre A and Manteca X (2007) Aversion to carbon dioxide stunning in pigs: effect of the carbon dioxide concentration and the halothane genotype. *Animal Welfare*, 16: 513-522.

- Van der Wal PG (1997) Causes for variation in pork quality. *Meat Science*, 46: 319-327.
- Wadsworth RM (1994) Vasoconstrictor and vasodilator effects of hypoxia. *Trends in Pharmacological Sciences* 15: 47-53.
- Warris PD and Brown SN (1987) The relationship between initial pH, reflectance and exudation in pig muscle. *Meat Science*, 20: 65-74.

**CAPÍTOL 7 / CHAPTER 7**

**Discussió General**

---



## DISCUSSIÓ GENERAL

Per garantir el benestar animal, el sacrifici s'ha de dur a terme de forma humanitària, de manera que l'animal no estigui sotmès a cap patiment innecessari. Amb aquest objectiu, la normativa europea estableix que prèviament al sacrifici, els animals han de ser atordits de manera que pateixin la pèrdua immediata de la consciència o, en el cas que aquesta no sigui immediata, que es dugui a terme evitant el dolor, l'ansietat o l'estrès. A més, la inconsciència ha de perllongar-se fins a la mort de l'animal per dessagnament (Reglament CE 1099/2009). El sistema d'atordiment ideal és aquell que, a part de garantir el benestar animal i la qualitat del producte final, preserva la seguretat laboral dels operadors que hi treballen i la seguretat alimentària dels consumidors. Els dos darrers requisits són indispensables i actuen com a filtre alhora de dissenyar nous sistemes d'atordiment. Tanmateix per poder atreure l'interès de la indústria càrnia cal que un mètode d'atordiment no tingui efectes negatius sobre la qualitat. Un dels sistemes que menys efecte té sobre la qualitat del producte final és l'atordiment per inhalació d'una concentració elevada de CO<sub>2</sub>. Per això, els darrers anys, l'ús d'aquest gas s'ha vist incrementat notablement als escorxadors comercials espanyols (Velarde *et al.*, 2000, 2001). L'atordiment per inhalació de CO<sub>2</sub> es basa en l'exposició a una elevada concentració de CO<sub>2</sub> (> 80 %) que indueix la inconsciència a través de la inhibició de les neurones. Aquest efecte es deu a la caiguda del pH del líquid cefaloraquídi (LCR), que banya el cervell i la medul·la espinal que provoca l'alliberament excessiu, al cervell, de l'aminoàcid neurotransmissor inhibitori àcid gamma-aminobutíric (GABA) (Raj, 2004), que indueix a un estat d'anestèsia i analgèsia (Woodbury i Karler, 1960). L'atordiment per exposició a elevades concentracions de CO<sub>2</sub> presenta dues avantatges principals. D'una banda permet que els animals siguin conduïts en grup fins a la zona d'atordiment la qual cosa disminueix l'estrès pre-sacrifici (Velarde *et al.*, 2000). De l'altra, la qualitat de la carn i de la canal es veu menys perjudicada que en comparació a altres sistemes d'atordiment (p. ex. electronarcosi o atordiment mecànic) (Velarde *et al.*, 2000, 2001).

Malgrat els avantatges del CO<sub>2</sub>, l'ús d'aquest gas ha estat criticat des del punt de vista del benestar animal ja que la seva inhalació provoca aversió (Cantieni, 1976; Raj i Gregory, 1995; Velarde *et al.*, 2007) i sensació d'asfíxia (Raj i Gregory, 1996; Raj, 1999; Velarde *et al.*, 2007) en porcs. A més, aquests efectes es veuen agreujats pel fet

que la pèrdua de la consciència no és immediata (Dodman, 1977; Gregory *et al.*, 1987; Raj i Gregory, 1996; Martoft *et al.*, 2001; Holst, 2002).

Una de les alternatives que s'han postulat per a una concentració elevada de CO<sub>2</sub> és la inhalació d'una atmosfera anòxica (< 2 % O<sub>2</sub>) mitjançant la barreja d'un gas inert amb baixes concentracions de CO<sub>2</sub> (< 30 %) ja que s'ha demostrat que, per sota d'aquesta concentració, el CO<sub>2</sub> és molt menys aversiu (Raj i Gregory, 1996; Dalmau *et al.*, 2010b). El gas inert que es pot obtenir més fàcilment de l'atmosfera és el nitrogen ja que l'aire atmosfèric conté un 79 % de nitrogen. És per això que, en cas que es demostrï que millora el benestar animal i que a la vegada no altera la qualitat del producte final, podria ser el gas d'elecció per a l'atordiment en molts escorxadors comercials.

Per a l'avaluació del benestar animal, els paràmetres més importants a tenir en compte durant l'atordiment inhalatori és el grau d'aversió al gas i el temps que triga en induir la a la inconsciència. D'altra banda, la qualitat del producte final està determinada per la qualitat de la canal i la de la carn. Per tant, conèixer el grau d'afectació d'aquests paràmetres permetrà determinar en quina mesura la inhalació d'altres concentracions de nitrogen amb CO<sub>2</sub> podria ser un mètode d'atordiment que garanteix el benestar en porcí.

En aquests estudis, les barreges que s'ha estudiat han sigut 70% N<sub>2</sub> i 30% CO<sub>2</sub> (70N30C), un 80% N<sub>2</sub> i 20% CO<sub>2</sub> (80N20C) i un 85% N<sub>2</sub> i 15% CO<sub>2</sub> (85N15C) en comparació amb un 90% de CO<sub>2</sub> (90C) i amb l'aire atmosfèric.

### **1 AVERSIÓ A LES BARREGES DE GASOS**

En l'atordiment per inhalació de gasos la pèrdua de la consciència es produeix de manera gradual. Per garantir el benestar animal, cal que, tal com estableix la normativa, la pèrdua de la consciència es produeixi sense causar dolor, ansietat o estrès. La inhalació de gasos compostos per CO<sub>2</sub> i nitrogen, pot provocar aversió o sensació de falta d'aire.

Per avaluar l'aversió a l'exposició d'un gas, els mètodes d'avaluació del comportament que més s'han utilitzat han estat el tests d'aversió per aprenentatge (Rushen, 1986; Jongman, 2000; Velarde *et al.*, 2007; Dalmau *et al.*, 2010b) d'una banda i l'avaluació dels comportaments indicadors d'aversió (Dodman, 1977; Gregory, 1996; Velarde *et*



*al.*, 2007; Dalmau *et al.*, 2010b) de l'altra. Aquests dos mètodes permeten reflectir la magnitud del rebuig d'un animal cap a una situació que considera negativa.

### 1.1 Aversió per aprenentatge

En els tests d'aversió per aprenentatge, els animals són exposats repetides vegades a una mateixa situació. La resistència a tornar a exposar-se a aquesta situació permetrà establir el grau d'aversió a aquesta situació. En porcs exposats a un determinat gas, el temps a entrar a la gàbia d'exposició i el maneig necessari per fer entrar els animals dins la gàbia permeten inferir aquest grau d'aversió. Tanmateix, l'aversió no solament està donada pels efectes del gas sinó també per la por que suposa entrar en un espai tancat i baixar a l'interior d'un pou, com passa en el cas de l'atordiment inhalatori. Segons Velarde *et al.* (2007) i Dalmau *et al.* (2010b), un cop els animals han estat exposats repetides vegades al moviment de descens a l'interior d'un pou, la por desapareix.

D'acord amb els nostres resultats, un cop els animals van estar habituats a les condicions experimentals, en cap de les tres barreges de gas estudiades va augmentar significativament el temps per entrar a la gàbia així com tampoc va disminuir el percentatge d'animals que hi entraven voluntàriament. Així doncs, sense perjudici de l'efecte que tingui el gas sobre els animals, aquests no recorden la seva inhalació com un estímul aversiu. Aquests resultats contrasten amb els obtinguts durant l'exposició a concentracions de 70 % i 90 % de CO<sub>2</sub> ( Velarde *et al.*, 2007), que provocava un augment dels temps i del percentatge d'animals que s'havia d'empènyer dins la gàbia. La comparació dels nostres resultats amb els de Velarde *et al.* (2007) confirma la hipòtesi inicial, plantejada per Raj i Gregory (1996), segons la qual l'exposició a un percentatge menor del 30 % de CO<sub>2</sub> redueix l'aversió respecte a elevades concentracions de CO<sub>2</sub>. No obstant, en un altre experiment en què els animals eren exposats a concentracions inferiors al 30 % de CO<sub>2</sub> o fins i tot a barreges que no contenien CO<sub>2</sub> (Dalmau *et al.*, 2010b), també es produïa aquest augment del rebuig a l'exposició al gas. Davant d'això, els autors van concloure que l'aversió a la inhalació del gas podia estar condicionada pel dolor que provocaven les fortes contraccions musculars. En aquest sentit, tal com ha estat esmentat per diferents autors (Raj *et al.*, 1999; Troeger *et al.*, 2005) i han confirmat els nostres resultats, l'exposició a una atmosfera que contingui menys d'un 2 % d'O<sub>2</sub> i una baixa concentració de CO<sub>2</sub> (< 30 %) provoca una fase més intensa i més llarga de contraccions musculars en comparació

amb un 90 % de CO<sub>2</sub>, les quals podrien provocar lesions a l'animal. Aquestes lesions podrien provocar que l'exposició sigui reconeguda com un estímul aversiu en sessions posteriors. Una major afectació dels animals de l'experiment de Dalmau *et al.* (2010b) podria haver estat provocada pel fet que els animals van estar sotmesos durant més sessions i també a més temps d'exposició en comparació amb el nostre experiment. Aquest augment del temps va desencadenar en un increment del període de contraccions musculars i de la probabilitat que els animals patissin qualsevol lesió.

### **1.2 Conductes indicadores d'aversion**

Per a l'avaluació dels comportaments d'aversion a les tres barreges de gasos de nitrogen i CO<sub>2</sub>, es van dur a terme dos dissenys experimentals diferents establint un gas control també diferent. En el primer experiment, que correspon al capítol 3, els animals eren introduïts a un pou que contenia una barreja de gas durant quatre sessions consecutives, la primera de les quals contenia aire atmosfèric i s'establia com a control. Les següents sessions eren considerades com a tractament i els animals eren sotmesos a un dels tres tipus de gasos a estudiar (70N30C, 80N20C i 80N15C). En l'altre experiment (capítol 6), els animals eren exposats una vegada a un dels tres tipus de gas (70N30C, 80N20C, 80N15C) o bé a una barreja que contenia 90C el qual s'establia com a control.

#### **1.2.1 Intents de retirada i d'escapada**

D'acord amb els resultats obtinguts en el primer experiment, l'exposició a diferents concentracions de nitrogen i CO<sub>2</sub>, augmenta el percentatge d'animals que intenten retirar-se en comparació amb els animals exposats a l'aire atmosfèric. Quan la comparació es va dur a terme amb 90C, contràriament al que seria d'esperar, no apareixien diferències entre aquests gasos. Tanmateix, en l'experiment en el qual es va dur a terme aquesta comparació entre barreges de nitrogen i 90C, els animals no havien estat familiaritzats amb la isolació dins d'una gàbia i el descens en un pou, per la qual cosa els intents de retirada podrien estar relacionats amb la por a aquesta situació nova.

El percentatge d'animals que van mostrar intents d'escapada en el primer experiment va ser més elevat quan els animals eren exposats a les barreges de nitrogen i CO<sub>2</sub> que a l'aire atmosfèric. Quan la comparació es va fer amb el 90C, el percentatge era menor durant l'exposició a les tres barreges de nitrogen i CO<sub>2</sub>.

Cal destacar també que en els intents de retrocés i d'escapada no es van detectar diferències entre les tres mostres de nitrogen.

### 1.2.2 Fase d'excitació muscular

La importància sobre el benestar animal de la fase de contraccions musculars, depèn de l'estat de consciència dels animals mentre aquestes es duen a terme. Existeixen diferents sistemes per avaluar la pèrdua de la consciència. La pèrdua de l'equilibri ha estat utilitzada com a indicador de l'inici de la pèrdua de la consciència (Raj i Gregory, 1996). Tanmateix alguns autors afirmen que la consciència de l'animal pot perllongar-se fins després de perdre la postura (Hoenderken, 1983; Rodríguez *et al.*, 2008). Aquest desacord implica que siguin necessaris altres indicadors més fiables per predir la consciència.

La mesura de l'electroencefalograma (EEG) ha estat utilitzada en diferents estudis per determinar l'activitat cerebral durant l'atordiment en porcs (Raj *et al.*, 1997; Martoft *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2008). A partir de l'activitat cerebral es pot inferir el grau d'inconsciència en què es troba un animal en cada moment. A partir d'aquí, es poden quantificar aquells comportaments que l'animal té de manera voluntària quan la seva activitat cerebral es manté normal o, el que és el mateix, en estat de consciència.

Tot i que la majoria de gasos narcòtics provoquen una fase d'excitació muscular durant la inducció a la inconsciència (Abraini *et al.*, 1988), característica del tercer estadi de l'anestèsia general mentre l'animal està inconscient (Muir, 2007), en el cas del CO<sub>2</sub>, l'estat de consciència en el qual transcorre aquesta fase d'excitació muscular genera controvèrsies. Forslid (1987) establí que segons el canvi en el patró de l'EEG que es dona abans de l'inici de les contraccions, aquestes apareixien quan el porc ja està inconscient. Contràriament, tant Hoenderken (1983) com Rodríguez *et al.* (2008), també per mitjà de l'EEG, van afirmar que la pèrdua de la consciència esdevé després de l'excitació i, per tant, que aquests moviments, al inici, són voluntaris i representen intents de fugida. Dodman (1977) va observar aquest comportament en porcs exposats a concentracions del 50 % al 80 % de CO<sub>2</sub> i ho va relacionar amb moviments de rebuig a la inhalació.

L'excitació muscular ha estat observada durant la exposició a les quatre barreges de gasos (70N30C, 80N20C, 85N15C i 90C), que s'han dut a terme en aquesta tesi. Segons els resultats obtinguts en l'avaluació de l'activitat cerebral de les quatre barreges de

gasos, just abans que comencés la fase d'excitació muscular, l'activitat cerebral, mesurada mitjançant l'IoC, era similar a la que hi havia durant el registre basal. D'altra banda, el descens significatiu de l'activitat cerebral va començar instants després de la fi de l'excitació muscular. Tot i que amb aquests resultats no podem confirmar el moment precís en que s'inicia la inconsciència, és probable que la primera fase d'excitació siguin moviments voluntaris de rebuig a la inhalació del gas però que seguidament aquests es podrien transformar en convulsions i per tant en moviments involuntaris.

El percentatge d'animals amb fase d'excitació muscular va variar entre els tres experiments. En el primer (capítol 3), el grup exposat a 80N20C va mostrar menys prevalença d'animals amb excitació muscular que els grups 70N30C i 85N15C. En canvi, en els dos experiments posteriors (capítol 5 i 6) la quantitat d'animals que mostraven aquesta fase d'excitació era similar entre tractaments.

A més, la durada d'aquesta fase es va veure influenciada significativament per la barreja de gas inhalada. Amb el 90C, la duració de l'excitació muscular era menor que amb 70N30C, 80N20C i 85N15C. Aquest fet s'explica perquè l'anòxia té principalment efecte sobre els centres neuronals superiors, entre els quals la formació reticular caudal, responsables dels moviments involuntaris durant la inconsciència (Ernsting, 1965), però el CO<sub>2</sub>, a més, també deprimeix les neurones del tronc cerebral i de la medulla espinal, que són responsables de la coordinació motora (Raj, 1999). Així doncs, en una atmosfera amb poca concentració de O<sub>2</sub>, la presència de CO<sub>2</sub> actua reduint la fase inconscient del període d'excitació muscular respecte a l'exposició a una atmosfera anòxica.

### 1.2.3 Vocalitzacions

En determinades condicions, les vocalitzacions poden representar una manera d'expressar por, ansietat o dolor en porcs. Segons EFSA (2004), l'aparició de vocalitzacions durant l'atordiment pot ser indicatiu d'un atordiment ineficaç. Tanmateix, per a la correcta interpretació de les vocalitzacions, és determinant conèixer l'estat de consciència en el qual es produeixen ja que aquestes poden ser considerades signes d'aversion només en el cas que es duguin a terme de forma conscient (Raj i Gregory, 1995). Segons l'estat de consciència dels animals, diferents autors s'han referit a 2 tipus de vocalitzacions. D'una banda, Gregory *et al.* (1987) estableix que les vocalitzacions poden ser causa de l'estrès que pateix l'animal durant l'exposició al gas.

De l'altra, l'any 1977 Dodman assegurava que, durant l'exposició a elevades concentracions de CO<sub>2</sub>, la mort va acompanyada habitualment de crits apagats que poden confondre's amb vocalitzacions. També Raj (1999) va justificar que les vocalitzacions tenien lloc quan els animals havien perdut la consciència. Aquest autor es va basar en el fet que les vocalitzacions s'iniciaven després de la pèrdua dels potencials evocats auditius (indicadors de la pèrdua de la resposta del còrtex cerebral) i després de l'aparició del *gagging* (indicador d'inconsciència profunda). En els nostres experiments, l'activitat cerebral en el moment en què es duïen a terme les vocalitzacions no es va poder avaluar a causa del fet que aquestes transcorrien durant el període d'excitació muscular. Tanmateix, tenint en compte els indicadors d'inconsciència que havia utilitzat Raj (1999) (disminució de l'activitat cerebral i aparició del *gagging*), cap d'aquests s'havia donat quan els animals començaven a vocalitzar per la qual cosa no es pot argumentar que les vocalitzacions no van succeir mentre l'animal era conscient.

En tres dels experiments que s'han dut a terme en aquesta tesi s'han avaluat les vocalitzacions. En el primer experiment (capítol 3), tot i que els animals només hi van estar exposats durant 35 s, en totes les barreges de gasos, el percentatge d'animals que van vocalitzar va ser d'aproximadament el 40 % mentre que cap animal ho va fer quan eren exposats a l'aire. En el tercer experiment (capítol 5), els animals eren exposats entre 2 o 3 min (90C) i 3 o 5 min (70N30C, 80N20C i 85N15C) a les diferents barreges de gasos. En el quart experiment (capítol 6), es van utilitzar les mateixes barreges de gasos que al capítol 5 però el temps d'exposició va ser de 4 min 30 s. Es van observar vocalitzacions en gairebé tots els animals exposats a les barreges de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> però quan s'exposaven a 90C el percentatge d'animals que mostraven aquest comportament queia fins a menys d'un 10 % en el 3er experiment o desapareixia en el 4rt.

Les diferències en el percentatge de vocalitzacions durant l'exposició a les mesclades de nitrogen i CO<sub>2</sub> entre els experiments podria ser causades per la diferència de temps d'exposició. Segons aquests resultats, és probable que es necessiti una exposició de més de 35 s per arribar a provocar el grau d'ansietat o estrès que estimuli les vocalitzacions en tots els animals i, per tant, no seria un indicador fiable d'estrès durant l'atordiment inhalatori. Tanmateix, les vocalitzacions són més freqüents en els animals exposats a les barreges de nitrogen i CO<sub>2</sub> estudiades en comparació a 90C i, al mateix temps, més freqüents en qualsevol de les quatre barreges de gasos estudiades que en comparació a l'exposició a l'aire atmosfèric. Aquests resultats, a *priori* indicarien que les mesclades de

nitrogen són més aversives que una elevada concentració de CO<sub>2</sub>. Tanmateix cal destacar que segons Curran (1996; 2000) en presència d'elevades concentracions de CO<sub>2</sub> els porcs tanquen la glotis per la qual cosa les vocalitzacions podrien veure's impedides durant l'exposició a aquest gas. Amb tot, cal tenir en compte que l'absència de vocalitzacions no garanteix l'absència de dolor, ansietat o estrès (EFSA, 2004).

### 1.2.4 Gasping

Segons Raj (1999), l'exposició inicial a una concentració elevada de diòxid de carboni resulta desagradable en porcs i, els animals evitaran, sempre que puguin, aquest tipus d'atmosfera. Aquesta aversió al CO<sub>2</sub> rau en dos propietats d'aquest gas. En primer lloc, el CO<sub>2</sub> és un gas àcid i resulta picant quan és inhalat en elevades concentracions. En segon lloc, és un potent estimulador respiratori que causa malestar associat a la hiperventilació (Raj i Gregory, 1996) i a la sensació de falta d'aire (Stark *et al.*, 1981; Gregory *et al.*, 1990). El *gasping* (o exhalació), és una respiració profunda que es caracteritza perquè els animals tenen la boca ben oberta i el coll ben estirat, que està considerada un indicador de la sensació de falta d'aire en porcs (Lambooy *et al.*, 1999; Velarde *et al.*, 2007). L'origen d'aquest comportament rau en l'activitat medul·lar residual del tronc cerebral quan aquest està sota els efectes de la hipercàpnia (Gregory, 2004). Tot i que és un comportament reflex, aquest es dona sempre mentre l'animal està conscient.

Raj i Gregory (1996) suggereixen que amb concentracions de fins a un 30 % de CO<sub>2</sub> en una atmosfera anòxica, la sensació de falta d'aire és moderada però que, tanmateix, augmenta a mesura que s'incrementa la concentració de CO<sub>2</sub>. Aquest comportament es va observar en tots els tractaments (70N30C, 80N20C, 85N15C i 90C). En aquest sentit, tant si l'atmosfera contenia un 90 % de CO<sub>2</sub> com un 15 %, en tots els grups es va observar aquest comportament associat a la respiració. De tota manera, cal fer referència a la disminució del nombre d'animals que mostraven aquest comportament quan la concentració de CO<sub>2</sub> disminuïa. Segons els nostres resultats, el descens significatiu del *gasping* es va produir amb les barreges que contenien un 20 % o menys de CO<sub>2</sub> suggerint que aquest comportament està més relacionat amb l'increment de la concentració de CO<sub>2</sub> que a la disminució de l'O<sub>2</sub>.

En resum, a través de l'anàlisi de tots els comportaments indicadors d'aversió, es pot afirmar que tal i com han apuntat autors com Raj i Gregory (1996), Raj (1999) i EFSA

(2004), l'exposició a una anòxia hipercàpnica, definida per una atmosfera de nitrogen i una concentració atmosfèrica inferior al 2 % de O<sub>2</sub> i al 30 % de CO<sub>2</sub>, redueix significativament l'aversion en comparació a elevades concentracions de CO<sub>2</sub>. Tot i això, tal com mostren les comparacions dels intents de retirada i d'escapada, de les vocalitzacions i del gasping, entre les tres barreges de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> amb l'aire, aquestes són aversives.

## 2 INDUCCIÓ A LA INCONSCIÈNCIA

La pèrdua de consciència es el moment en el qual un animal passa a no tenir capacitat per experimentar dolor, patiment o estrès. Per evitar a l'animal qualsevol tipus de patiment durant el sacrifici, un dels objectius principals d'un sacrifici humanitari és causar la pèrdua de la inconsciència instantània prèviament al sacrifici o en el cas que aquesta no sigui instantània que es produeixi de forma indolora. Per determinar el moment que es produeix la pèrdua de la consciència calen sistemes fiables d'avaluació.

Els mètodes basats en l'EEG proporcionen mesures vàlides de la capacitat de resposta i de la funció del cervell i han estat àmpliament utilitzats per avaluar els sistemes de sacrifici en mamífers i aus (Gregory, 1987). L'EEG ha estat acceptat com a mètode d'elecció per a l'avaluació de la consciència ja que és el sistema que presenta major fiabilitat (EFSA, 2004). Per dur a terme aquesta avaluació, el sistema utilitzat en aquesta tesi ha estat l'Index of Consciousness, obtingut gràcies a l'IoC-view<sup>®</sup>. Aquest sistema ha estat inicialment desenvolupat i validat per a l'avaluació de l'activitat cerebral en humans (Revuelta *et al.* 2008). Tot i això, gràcies a la precisió del seu algoritme i a la possibilitat d'avaluar l'activitat cerebral mitjançant tecnologia sense cables, es va considerar un mètode adequat per utilitzar-lo en l'avaluació de la inconsciència durant l'atordiment inhalatori en condicions similars a les que es donen als escorxadors comercials en porcí.

### 2.1 Validació de l'IoC com a mesura de l'activitat cerebral en porcs

Ja que l'IoC-view<sup>®</sup> no s'havia utilitzat mai en porcs, abans de dur a terme l'avaluació de l'activitat cerebral durant l'atordiment, es va posar a prova aquest aparell durant un procediment d'anestèsia injectable (Propofol) en sis porcs. Durant l'experiment es van comparar els resultats de l'activitat cerebral amb el moment en què es produïa la pèrdua de la postura així com la presència de reflex corneal. Segons els resultats del IoC, es va

observar que la disminució de l'activitat cerebral estava estretament relacionat la pèrdua de l'equilibri. D'altra banda, no es van detectar canvis de la l'activitat cerebral durant la pèrdua i la recuperació del reflex corneal. No obstant això, el reflex corneal comporta alguns problemes d'interpretació sobre l'estat de consciència. Alguns autors com Holst (2001) i Rodríguez *et al.* (2008) l'han utilitzat com a indicador de consciència durant l'atordiment però, tal com apunten Anil i McKinstry (1991), estrictament és un indicador de l'activitat del tronc cerebral i la seva relació amb la funció cortical no és clara. En tot cas, d'acord amb els nostres resultats, es va observar que el reflex corneal desapareixia en tots els animals en el mateix moment en què apareixia el ESR, el qual està associat amb la depressió profunda del còrtex cerebral (Haga *et al.*, 2002).

En resum, no es van poder identificar un reflex fisiològic fiable dels diferents estadis anestèsics però, en canvi, sí que s'ha pogut confirmar que l'IoC-view<sup>®</sup> pot ser utilitzat com un predictor fiable de l'activitat cerebral en porcs i que permet determinar el moment a partir del qual l'activitat cerebral decreix respecte dels valors de consciència i el moment en què s'arriba a un estat d'inconsciència profunda.

### **2.2 Avaluació de l'activitat cerebral en porcs durant la inhalació de 70N30C, 80N20C, 85N15C i 90C mitjançant el IoC.**

L'avaluació de l'activitat cerebral durant el procés d'atordiment mitjançant elevades concentracions de CO<sub>2</sub> s'ha dut a terme en diferents estudis (Hoenderken (1978), Forslid (1987), Ring *et al.* (1988), Martoft *et al.* (2002) i Rodríguez *et al.* (2008). Segons Forslid (1987) i Ring *et al.* (1988), en animals exposats a un 80 % de CO<sub>2</sub> la disminució de l'activitat cerebral és produeix entre 15 i 30 s des de l'inici de la exposició. Quan els porcs són exposats a una concentració del 90% de CO<sub>2</sub>, aquest temps varia segons la metodologia de l'experiment. Martoft *et al.* (2002) asseguren que la disminució de l'activitat cerebral es produeix als 14 s mentre que segons Rodríguez *et al.* (2008) això passa als 60 s. Quan el gas estava compost per una barreja d'argó i un 30% de CO<sub>2</sub>, l'inici de la baixada de l'activitat cerebral succeïa al voltant dels 17 s (Raj *et al.*, 1997).

En el tercer experiment d'aquesta tesi (capítol 5) es va avaluar l'activitat cerebral en porcs quan eren sotmesos a diferents concentracions de nitrogen i CO<sub>2</sub> (70N30C, 80N20C, 85N15C) i a un 90 % de CO<sub>2</sub> durant dos temps diferents d'exposició (2 o 3 min a 90C i 3 o 5 min a les mescles de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>). D'acord amb els resultats de l'IoC-



View<sup>®</sup>, els porcs exposats a 90C, 70N30C, 80N20C i 85N15C van mostrar una disminució de l'activitat cerebral als 37,6 s, 45,2 s, 46,9 s i 43,3 s, respectivament independentment del temps d'exposició.

En els resultats obtinguts en aquesta tesi així com els de Rodríguez *et al.*, (2008) el moment de perdre la consciència passa més tard que en comparació amb els resultats obtinguts per la resta d'autors esmentats. La raó d'aquesta discordança pot ser deguda a diferents factors. D'una banda, per efecte de la metodologia d'exposició a les mescles de gasos. En els estudis de Forslid (1988), Raj *et al.* (1999) i Martoft *et al.* (2001), els porcs eren submergits a l'atmosfera modificada suspesos en una llitera que s'introduïa en pocs segons a la concentració desitjada. Per contra, ja que es van voler simular les condicions comercials, en el nostre experiment així com en el de Rodríguez *et al.* (2008), els porcs eren submergits a un pou mitjançant una gàbia que tardava 23 s a arribar a la concentració desitjada. Així doncs, la velocitat d'exposició als gasos té un efecte sobre la inducció en què una exposició ràpida a la barreja de gas provoca una pèrdua més ràpida de la consciència.

Tot i que el mètode d'elecció per a l'avaluació de la consciència es l'EEG, la pèrdua de la postura s'ha postulat com un indicador fiable de l'inici de la inconsciència (Raj i Gregory, 1995). Aquest comportament involuntari, que permet una detecció fàcil i ràpida de les capacitats cognitives de l'animal, s'ha avaluat en els dos experiments en els quals s'han exposat els animals a diferents concentracions de nitrogen i CO<sub>2</sub> amb l'objectiu de provocar-los la inconsciència. En ambdós experiments, la pèrdua de l'equilibri es produïa abans quan els animals eren exposats a 90C en comptes de les mescles de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

Un dels objectius del tercer capítol d'aquesta tesi era determinar la relació que hi ha entre la pèrdua de l'equilibri i la pèrdua de la consciència. En aquell experiment, segons l'IoC-view<sup>®</sup>, quan els porcs eren anestesiats amb Propofol<sup>®</sup> es va observar que ambdós esdeveniments estaven estretament relacionats i l'equilibri es perdia de mitjana 7 s abans que la disminució de l'activitat cerebral. Quan es va avaluar l'activitat cerebral de porcs exposats a les diferents barreges de gasos, la disminució de l'activitat cerebral es donava 12 segons més tard que la pèrdua de l'equilibri. La pèrdua de la postura anava seguida en un 98 % dels casos d'una fase d'excitació muscular que feia impossible l'anàlisi de l'EEG la qual cosa va retardar el càlcul de l'IoC i la seva baixada. Així doncs, no es pot confirmar amb precisió quan es va produir la pèrdua de la consciència

durant la inhalació de les mescles 70N30C, 80N20C, 85N15C i 90C. Per tant, no es pot garantir que la pèrdua de l'equilibri es pugui utilitzar com un indicador fiable del moment en el qual es produeix la pèrdua de la consciència.

En estudis anteriors duts a terme en porcs (Raj *et al.*, 1997), en que s'induïa la inconsciència amb un 90 % d'argó, una barreja de 60 % d'argó i 30 % de CO<sub>2</sub> i un 90 % de CO<sub>2</sub>, es va arribar a la conclusió que el temps necessari per disminuir l'activitat cerebral (mesurada mitjançant potencials evocats auditius), va ser menor quan els porcs eren exposats a una atmosfera anòxica o d'anòxia hipercàpnica en comparació a la hipercàpnia. Inversament, els nostres resultats suggereixen que l'activitat cerebral disminueix abans en 90C que en les mescles de nitrogen i CO<sub>2</sub>. S'ha de tenir en compte que les mescles de nitrogen i CO<sub>2</sub> fan augmentar la durada de la fase de l'activitat muscular en comparació amb 90C, la qual podria retardar el càlcul de l'IoC. Tanmateix, els resultats del temps de pèrdua de l'equilibri reiteren que aquest va ser més curt en 90C que en les mescles de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. En aquest sentit, és probable que la respiració ràpida i profunda durant la hiperventilació provocada per la inhalació d'elevades concentracions de CO<sub>2</sub>, es tradueixi en un augment del consum de gas que es retroalimenta i que provoca l'escurçament del període d'inducció de la inconsciència (Forslid, 1992). Segons això, és possible que en l'exposició a altes concentracions de CO<sub>2</sub> provoqui una depressió del SNC i una pèrdua de consciència més ràpida que en les mescles de nitrogen i CO<sub>2</sub>.

### **2.3 Avaluació de la recuperació de la consciència**

Per assegurar un sacrifici humanitari cal que el període d'inconsciència i insensibilitat es perllongui fins a la mort, produïda pel dessagnament. L'atordiment per gasos pot ser un mètode reversible, ésestigui exposat l'animal i del temps d'exposició. Segons els resultats de l'IoC, el grup en què es van observar el major nombre d'animals atordits irreversiblement va ser en l'exposició de 90C durant 3 min. Per contra, els porcs atordits mitjançant 70N30C, 80N20C i 85N15C durant 3 min es van recuperar tots. D'altra banda, entre els animals exposats durant 2 min al 90C o 3 min a les barreges de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, no es van detectar diferències en els temps recuperació de l'activitat cerebral basal.

En condicions comercials, la recuperació de la consciència ha estat avaluada mitjançant alguns reflexos fisiològics, àmpliament descrits per Gregory *et al.* (1987) i per EFSA (2004). Entre aquests, els més utilitzats han estat el reflex corneal, la ritmicitat

respiratòria i la resposta a un estímul dolorós (EFSA, 2004; Nowak, 2007; Dalmau *et al.* 2009). La seqüència d'aparició d'aquests tres reflexos, es considera un indicador de la recuperació de la consciència. A tall d'exemple, segons els nostres resultats, els animals que van mostrar respostes positives a aquests tres reflexos van acabar recuperant l'IoC fins a valors basals la qual cosa evidencia la relació que hi ha entre la presència simultània d'aquests reflexos amb la recuperació de la consciència.

A diferència dels resultats de l'IoC, el reflex corneal, la ritmicitat respiratòria i la sensibilitat al dolor van aparèixer més aviat en els animals que van ser atordits amb la barreja 85N15C en comparació amb els que van ser atordits amb 90C. L'explicació d'aquesta diferència es basa en que l'hipòxia té un efecte diferent sobre el centre respiratori en comparació a la hipercàpnia. La crisi metabòlica provocada per la privació d'oxigen al cervell pot passar en qüestió de pocs segons després de la inhalació d'una atmosfera anòxica. No obstant això, l'activitat normal del cervell pot ser restaurada en els animals atordits per anòxia si se'ls administra oxigen o se'ls permet respirar aire atmosfèric. En canvi, els animals exposats a elevades concentracions de CO<sub>2</sub>, aquest gas tindrà un efecte additiu a la falta d'oxigen. Inevitablement doncs, la recuperació de la consciència en aquests animals atordits per anòxia és més ràpida (Raj, 1999) i més freqüent que amb elevades concentracions de CO<sub>2</sub>. Aquestes diferències en el temps de recuperació segons el gas no van ser detectades amb el IoC. En aquest sentit, la recuperació de l'activitat cerebral presentava una elevada variabilitat individual la qual cosa podria emascarar els efectes del gas tractament impeding que apareguessin diferències significatives entre ells. Aquesta variabilitat individual podria provocar que alguns animals es recuperin molt abans que altres. En aquest cas els temps d'exposició necessaris hauran de garantir que la inconsciència es mantingui fins a la mort per dessagnament en tots els animals.

D'aquesta manera, per tal d'evitar la recuperació, els porcs atordits amb nitrogen i mesclades de CO<sub>2</sub> hi haurien d'estar exposats durant cinc minuts com a mínim. Si això no fos possible, per tal de garantir que la inconsciència es mantingui fins a la mort de l'animal convindria que posteriorment a l'atordiment amb anòxia o anòxia hipercàpnica s'apliqui algun procediment. Raj (1999) proposa que aquest procediment podria ser una descàrrega elèctrica al cor que li provoqui una fibril·lació i, per tant, la parada cardíaca.

En síntesi, en animals exposats a 70N30C, 80N20C i 85N15C la pèrdua de la consciència succeeix més tard i, tot i que hi ha estat exposats per un període més llarg, produeixen un període d'inconsciència més curt que els exposats a 90C.

### **3 QUALITAT DE LA CARN I DE LA CANAL**

Tal com s'ha dit anteriorment, per tal que un sistema d'atordiment pugui ser aplicat en condicions comercials, cal que aquest, a més de respectar el benestar animal, no afecti negativament la qualitat final del producte. A tall d'exemple, un dels principals motius alhora de canviar el sistema d'atordiment elèctric pels de CO<sub>2</sub> a la majoria d'escorxadors comercials europeus ha estat la millora de la qualitat que s'obté utilitzant aquest sistema (Velarde *et al.*, 2000; 2001). És important, doncs, conèixer com afecta l'atordiment de porcs mitjançant la inhalació d'una atmosfera d'anòxia hipercàpnica a la qualitat de la carn i de la canal. Els principals efectes negatius de l'atordiment considerats per la indústria són la presència de carns pàl·lides, toves i exsudatives (PSE) i les hemorràgies a la canal i fractures òssies (Rosenvold i Andersen, 2003).

#### **3.1 Qualitat de la carn**

La presència de carns PSE pot estar determinada pel grau d'estrès que ha patit l'animal en els moments previs a la seva mort així com per l'activitat muscular durant el procés d'atordiment (Terlouw, 2005). La nostra hipòtesi inicial era que la disminució de l'aversion provocada per la inhalació de les barreges de nitrogen i CO<sub>2</sub> en comparació amb elevades concentracions de CO<sub>2</sub> disminuiria el grau d'estrès presacrifici i milloraria, o com a mínim no empitjoraria, la qualitat de la carn. Tanmateix els resultats no van poder evidenciar aquesta hipòtesi. Com menys concentració de CO<sub>2</sub>, menys era el percentatge d'animals que mostraven comportaments indicadors d'aversion (intents d'escapada i gasping), però major era el percentatge de canals exsudatives i amb petèquies. L'explicació d'aquest fenomen es deu a la fase d'excitació muscular que té lloc durant l'atordiment. Segons Troeger i Woltersdorf (1991) l'aparició de carns PSE està notablement influenciada per la intensitat de l'activitat muscular que té lloc durant la fase d'excitació. Aquesta intensitat depèn de la concentració atmosfèrica de CO<sub>2</sub> que s'utilitza per atordir els animals. Segons aquests autors, animals exposats a concentracions inferiors al 80 % de CO<sub>2</sub> van mostrar una major activitat muscular durant la fase d'excitació.

Segons els nostres resultats, a part d'una disminució de l'aversió respecte a l'exposició a 90C, les barreges de nitrogen que contienien menor percentatge de CO<sub>2</sub> (80N20C i 85N15C) també van provocar un augment de la durada de la fase d'excitació muscular. Aquest augment de l'activitat causa un esgotament de les reserves de glicogen muscular que deriva en una caiguda més ràpida del pH *post mortem*. A partir d'aquí es produeix una desnaturalització de les proteïnes musculars que condueix a una disminució de la capacitat de retenció d'aigua i de la consistència de la carn, cosa que es considera inacceptable.

### 3.2 Qualitat de la canal

Quant a la qualitat de la canal, els dos defectes més freqüents que n'afecten la qualitat per efecte del procés d'atordiment són les hemorràgies i les fractures òssies. Solen aparèixer a causa d'un període de contraccions musculars intenses. D'acord amb els nostres resultats, no es van observar canals amb ossos fracturats però sí petites hemorràgies de menys de 2 mm (petèquies) al múscul semimenbranós. A més, aquestes només es van mostrar a les canals procedents d'atordiment amb barreges de nitrogen (25 %) mentre que no n'hi va haver cap al grup atordit amb 90C. Segons Troeger *et al.* (2005), les petèquies es deuen a dos factors principals que succeeixen durant l'atordiment per anòxia. D'una banda, se sap que la falta d'oxigen provoca una alliberació de catecolamines (adrenalina i noradrenalina) al torrent circulatori (Machold *et al.*, 2003) que provoca, entre altres coses, una vasodilatació. En conseqüència, augmenten el reg i la pressió sanguínia, els quals poden provocar algun trencament capil·lar. En segon lloc, si les contraccions musculars durant l'atordiment són molt intenses, provoquen alguns trencaments de les fibres musculars associades al trencament dels capil·lars que les abasteixen, la qual cosa deriva en una hemorràgia. Així, de manera paral·lela a l'efecte sobre la qualitat de la carn, la fase d'excitació muscular més llarga observada en les barreges de nitrogen i CO<sub>2</sub> també va tenir efecte sobre la incidència d'hemorràgies a la canal.

En referència a la qualitat del producte final, l'atordiment amb barreges de nitrogen i menys d'un 30% de CO<sub>2</sub> fa augmentar la incidència de carns exsudatives així com de canals amb presència d'equimosis respecte a l'atordiment per inhalació d'un 90 % de CO<sub>2</sub>.

#### 4 BIBLIOGRAFIA

- Abraini JH, Kriem B, Balon N, Rostain JC and Risso JJ (2003) Gamma-Aminobutyric Acid Neuropharmacological Investigations on Narcosis Produced by Nitrogen, Argon, or Nitrous Oxide. *Anesthesia and Analgesia* 96:746-9.
- Anil MH and McKinstry JL (1991) Reflexes and loss of sensibility following Headtoback electrical stunning in sheep. *Veterinary Record*, 128:106-107.
- Cantieni J (1976) Ein Beitrag zur carbon dioxide-Betäubung von Schlachtschweinen. *Schweiz Arch Tierheilk*, 119: 255-375.
- Council Regulation (EC) No 1099/2009 2009 The protection of animals at the time of killing. European Community Official Journal L303: 1-30.
- Curran AK, O'Halloran KD, and Bradford A (1996) Ventilatory and upper air way muscle responses to upper airway CO<sub>2</sub> in anaesthetized neonatal guinea-pigs. *Frontiers in Arterial Chemoreception*. 410: 449-452.
- Curran A, O'Halloran KD and Bradford A (2000) Effects of upper airway carbon dioxide on upper airway resistance and muscle activity in young guinea-pigs. *European Respiratory Journal* 15: 902-905.
- Dalmau A, Temple D, Rodriguez P, Llonch P and Velarde A (2009) Application of the Welfare Quality<sup>®</sup> protocol at pig slaughterhouses. *Animal Welfare* 18:497-505.
- Dalmau A, Rodríguez P, Llonch P and Velarde A (2010) Stunning pigs with different gas mixtures. Part 2: aversion in pigs. *Animal Welfare* 19, 324-333.
- Dodman NH, (1977) Observations on the use of the Wernburg dip- lift carbon dioxide apparatus for pre-slaughter anaesthesia of pigs. *British Veterinary Journal*, 133: 71-80.
- EFSA 2004 Welfare Aspects of Animal Stunning and Killing Methods. Scientific Report of the Scientific Panel for Animal Health and Welfare on a Request from the Commission. Question. Adopted on the 15th of June 2004, Brussels, Belgium.  
[http://www.efsa.eu.int/science/ahaw/ahaw\\_opinions/495/opinion\\_ahaw\\_02\\_ej45\\_stunning\\_report\\_v2\\_en1.pdf](http://www.efsa.eu.int/science/ahaw/ahaw_opinions/495/opinion_ahaw_02_ej45_stunning_report_v2_en1.pdf). Accessed on March 14th 2012.

- 
- Ernsting J (1965) The effect of anoxia on the central nervous system. In: A Text Book of Aviation Physiology, J.A. Gillies (Ed.), Pergamon Press, Oxford, UK.
  - Forslid A (1987) Transient neocortical, hippocampal and amygdaloid EEG silence induced by one-minute inhalation of high concentration carbon dioxide in swine. *Acta Physiologica Scandinavica*, 130:1-10.
  - Forslid A (1992) Muscle spasms during pre-slaughter carbon dioxide anaesthesia in swine. *Fleischwirtschaft*, 72:167-168.
  - Gregory NG 2004. Respiratory system. In: Physiology and behaviour of animal suffering. UFAW Animal Welfare Series. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
  - Gregory NG, Moss BW and Leeson RH (1987) An assessment of carbon dioxide stunning of pigs. *Veterinary Record*, 121: 517-518.
  - Gregory NG, Raj ABM, Audsley ARS and Daly CC (1990) Effects of carbon dioxide on man. In: The use of carbon dioxide for the stunning of slaughter pigs. Report of a meeting of experts held in Heeze from the 26-27th January 1990. *Fleischwirtschaft*, 70: 1173-1174.
  - Hall LW (2001) Chapter 2: Patient monitoring and clinical measurement. In: Veterinary Anaesthesia (Third edition). Hall LW, Clarke KW and Trim CM (Eds). W B Saunders, Philadelphia, USA.
  - Hoenderken R (1978) Elektrische bedwielming van slachtvarkens (Electrical stunning of slaughter pigs). Doctoral Dissertation, University of Utrecht, The Netherlands.
  - Hoenderken R (1983) Electrical and carbon dioxide stunning of pigs for slaughter. In *Stunning of Animals for Slaughter*. G. Eikelenboom (Ed.). Martinus Nijhoff, Boston, USA.
  - Holst S (2001) Carbon dioxide stunning of pigs for slaughter – practical guidelines for good animal welfare. In: proceedings of 47th International Congress of Meat Science and Technology, Krakow, Poland.
  - Holst S (2002) Behaviour in pigs immersed into atmospheric air or different carbon dioxide concentrations. Danish Meat Research Institute. Internal report Ref.no. 02.709 7295. Unpublished data.

- Jongman EC, Barnett JL and Hemsworth PH (2000) The aversiveness of carbon dioxide stunning in pigs and a comparison of the CO<sub>2</sub> stunner crate vs the V-restrainer. *Applied Animal Behaviour Science* 67: 67-76.
- Machold U, Troeger K and Moje M (2003) Gas stunning of pigs – a comparison of carbon dioxide, argon, a nitrogen–argon-mixture and argon/carbon dioxide, (2 steps-system) under animal welfare aspects. *Fleischwirtschaft*, 83: 109–114.
- Martoft L, Lomholt L, Kolthoff C, Rodriguez BE, Jensen EW, Jørgensen PF, Pedersen HD and Forslid A (2001) Effects of carbon dioxide anaesthesia on central nervous system activity in swine. *Laboratory Animal*, 36: 115-126.
- Martoft L, Lomholt L, Kolthoff C, Rodríguez BE, Jensen EW, Jorgensen PF, Pedersen HD and Forslid A (2002) Effects of CO<sub>2</sub> anaesthesia on central nervous system activity in swine. *Laboratory Animals*, 36: 115-126.
- Muir WW (2007) Considerations for general anaesthesia. In: *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* (Fourth edition). Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA (Eds.). Blackwell Publishing, Boston, USA.
- Nowak B, Mueffling TV and Hartung J. (2007) Effect of different carbon dioxide concentrations and exposure times in stunning of slaughter pigs: Impact on animal welfare and meat quality. *Meat Science*, 75:290–298.
- Raj ABM (1999) Behaviour of pigs exposed to mixtures of gases and the time required to stun and kill them: welfare implications. *Veterinary Record*, 144: 165-168.
- Raj ABM (2004) Stunning - CO<sub>2</sub> and other gases. In: *Enciclopedia of Meat Science*. Devine C and Dikeman M (Eds.). Elsevier Science, UK.
- Raj A.B.M. (2008) Welfare of pigs during stunning and slaughter. In: *Welfare of pigs from birth to slaughter*. L. Faucitano and A.L. Schaefer (Eds.). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Raj ABM and Gregory NG (1995) Welfare implications of the gas stunning of pigs 1. Determination of aversion to the initial inhalation of carbon dioxide or argon. *Animal Welfare*, 4: 273-280.



- Raj ABM and Gregory NG (1996) Welfare implications of the gas stunning of pigs 2. Stress of induction of anaesthesia. *Animal Welfare*, 5: 71-78.
- Raj ABM, Johnson SP, Wotton SB and McKinstry JL (1997) Welfare implications of gas stunning pigs. 3. The time to loss of somatosensory evoked potentials and spontaneous electroencephalogram of pigs during exposure to gases. *Veterinary Journal*, 153:329-340.
- Revuelta M, Paniagua P, Campos JM, Fernández JA, Martínez A, Jospin M and Litvan H (2008) Validation of the index of consciousness during sevoflurane and remifentanyl anaesthesia: a comparison with the bispectral index and the cerebral state index. *British Journal of Anaesthesia* 101, 653-658.
- Ring C, Erhardt W, Kraft H, Schmidt A, Weinmann HM, Berner H and Unshelm J (1988) Zur Betäubung von Schlachtschweinen mittels carbon dioxide (carbon dioxide anaesthesia for slaughter pigs). *Fleischwirtschaft*, 68: 1304-1307 and 1478-1484.
- Rodriguez P, Dalmau A, Ruiz-de-la-Torre JL, Manteca X, Jensen EW, Rodriguez B, Litvan H and Velarde A (2008) Assessment of unconsciousness during carbon dioxide stunning in pigs. *Animal Welfare*, 17: 341-349.
- Rosenvold K, Andersen HJ (2003) Factors of significance for pork quality - A review. *Meat Science*, 64:219-237.
- Rushen J (1986) The validity of behavioural measures of aversion: a review. *Applied Animal Behaviour Science*, 16: 309-323.
- Stark RD, Gambles SA and Lewis JA (1981) Methods to assess breathlessness in healthy subjects: A critical evaluation and application to analyse the acute effects of diazepam and promethazine on breathlessness induced by exercise or exposure to raised levels of carbon dioxide. *Clinical Science*, 61: 429-440.
- Terlouw C (2005) Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience. A brief review of recent findings. *Livestock Production Science*, 94:125-135.
- Troeger K and Woltersdorf W (1991) Gas anaesthesia of slaughter pigs. Stunning experiments under laboratory conditions with fat pigs of known

- halothane reaction type: meat quality and animal protection. *Fleischwirtschaft*, 71: 1063-1068.
- Troeger K, Machold U, Moje M and Behrschmidt M (2005) Gas stunning of pigs. A comparison of carbon dioxide, argon, a nitrogen/argon mixture and argon/ carbon dioxide under meat quality aspects. 3. Summary and discussion of results; conclusions. *Fleischwirtschaft*, 5: 109–111.
  - Velarde A, Gispert M, Faucitano L, Manteca X and Diestre A (2000). The effect of stunning method on the incidence of PSE meat and haemorrhages in pork carcasses. *Meat Science*, 55: 309-314.
  - Velarde A, Gispert M, Faucitano L, Alonso P, Manteca X and Diestre A (2001). Effects of the stunning procedure and the halothane genotype on meat quality and incidence of haemorrhages in pigs. *Meat Science*, 58: 313-319.
  - Velarde A, Cruz J, Gispert M, Carrión D, Ruiz-de-la-Torre JL, Diestre A and Manteca X (2007). Aversion to carbon dioxide stunning in pigs: effect of the carbon dioxide concentration and the halothane genotype. *Animal Welfare*, 16: 513–522.

## CONCLUSIONS

1. Els porcs no recorden l'exposició a les barreges de gas 70N30C, 80N20C i 85N15C a dins d'un pou com un estímul negatiu que tractin d'evitar en successives sessions.
2. Durant la inhalació de les mescles 70N30C, 80N20C i 85N15C els porcs pateixen aversió d'una magnitud semblant entre les diferents mescles. En qualsevol cas, el grau d'aversió que provoquen és menor que en la inhalació de 90C.
3. La sensació de falta d'aire produïda per la inhalació de CO<sub>2</sub> disminueix a partir de concentracions iguals o inferiors a un 20 % d'aquest gas.
4. L'*Index of Consciousness* (IoC) és un bon indicador de l'activitat cerebral en porcs durant l'anestèsia amb Propofol<sup>®</sup>, i pot ser útil per avaluar l'estat de consciència durant l'atordiment de porcs per inhalació de gasos.
5. L'inducció a la inconsciència amb les mescles de gasos 70N30C, 80N20C, 85N15C es més lenta que en l'exposició a 90C.
6. Durant l'exposició a 70N30C, 80N20C i 85N15C, els comportaments indicadors d'aversió com els intents d'escapada, els intents de retirada i el *gasp*ing transcorren mentre l'activitat cerebral es manté en valors de consciència.
7. Les barreges de gasos 70N30C, 80N20C, 85N15C provoquen una fase d'excitació muscular més llarga que el 90C. Les contraccions musculars que es produeixen durant aquesta fase impedeixen l'avaluació de l'activitat del cervell durant aquest temps i retarden el càlcul de l'*Index of Consciousness*.
8. La presència del reflex corneal, de la ritmicitat respiratòria i de la sensibilitat al dolor, de manera simultània, després de l'atordiment per exposició als gasos 70N30C, 80N20C, 85N15C i 90C són bons indicadors de l'inici de recuperació de l'activitat cerebral.
9. L'exposició durant 5 min a 70N30C, 80N20C i 85N15C i durant 3 min a 90C provoca la mort del 100% dels porcs. Si la durada d'exposició disminueix, el nombre d'animals que es recupera augmenta a 100% en 70N30C, 85N15C 80N20C i al 75% en 90C. Aquesta recuperació es produeix abans en porcs exposats a 85N15C que a 90C.
10. Per tal d'evitar la recuperació, els porcs atordits amb nitrogen i mescles de CO<sub>2</sub> hi haurien d'estar exposats durant un mínim de 5 min. Si el temps fos inferior, convindria que s'establís un sistema addicional d'atordiment irreversible que

s'apliqués a la sortida de l'exposició al gas i permetés perllongar la fase d'inconsciència fins la mort.

11. L'augment de la durada de la fase d'excitació muscular durant l'exposició a 70N30C, 80N20C i 85N15C en comparació a 90C es tradueix en un increment de la incidència de carn exsudativa així com de equimosis a la canal.

---

## CONCLUSIONS

1. Pigs do not remember the exposure to 70N30C, 80N20C and 85N15C gas mixtures in a pit as a negative stimulus to be avoided in consecutive sessions.
2. Inhalation of 70N30C, 80N20C and 85N15C mixtures provokes aversion in pigs irrespective of the gas mixture. Even though, aversion is less pronounced than that caused by 90C inhalation.
3. The sense of breathlessness provoked by the 90C inhalation decreases when the CO<sub>2</sub> concentration is equal or lower than 20% of this gas.
4. The Index of Consciousness (IoC) is a feasible indicator of the brain activity during Propofol<sup>®</sup> anaesthesia in pigs, and it could be useful to assess the state of consciousness during gas stunning in pigs.
5. The induction to unconsciousness is slower in pigs exposed to 70N30C, 80N20C i 85N15C compared to 90C.
6. During exposure to 70N30C, 80N20C i 85N15C, indicators of aversion such as retreat and escape attempts and *gasping* occurs while the brain activity maintains the level of consciousness.
7. The gas mixtures 70N30C, 80N20C, 85N15C provoke a longer muscular excitation phase than 90C. The muscular activity showed on during this period makes the assessment of the brain activity during that time impossible and delays the calculation of the Index of Consciousness.
8. The simultaneous presence of corneal reflex, rhythmic breathing and sensitivity to pain after stunning by exposure to 70N30C, 80N20C, 85N15C i 90C is a good indicator of the onset of brain recovering.
9. The 5 min exposure to 70N30C, 80N20C i 85N15C and 3 min to 90C cause the death of the majority of animals. If the duration of exposure decreases, the number of animal that recovers increases to 100% in 70N30C, 80N20C i 85N15C and to 75% in 90C. The recovery occurs before in pigs exposed to 85N15C than in pigs exposed to 90C.
10. In order to avoid recovery of consciousness before death, pigs stunned with N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> exposure should be exposed to the gas mixture during at least 5 min. If the time is shorter than this, an additive and irreversible stunning system that causes unconsciousness until brain death might be used.

11. The rise of the muscular excitation phase during the exposure to 70N30C, 80N20C i 85N15C compared to 90C results in an increase of the incidence of the exhudative meat and the number of ecchymosis in the carcass.



