

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**DISCRIMINAÇÃO DE SISTEMAS DE ALIMENTAÇÃO
EM OVINOS ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO DE
CAROTENÓIDES NO TECIDO ADIPOSEO E NO PLASMA**

Autor: Paulo Henrique Moura Dian
Orientador: Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado
Co-orientador (a): Sophie Prache

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
janeiro - 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**DISCRIMINAÇÃO DE SISTEMAS DE ALIMENTAÇÃO
EM OVINOS ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO DE
CAROTENÓIDES NO TECIDO ADIPOSEO E NO PLASMA**

Autor: Paulo Henrique Moura Dian
Orientador: Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado
Co-orientador (a): Sophie Prache

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
janeiro - 2007

On se dit...

De temps en temps étranger.

De temps en temps de notre côté.

Sans jamais se regarder.

Sans jamais se parler.

On se dit "On est amis".

On se dit "C'est pour la vie".

Mais quand le vent change de bord.

On se demande si ça tient encore.

Regardons-nous de temps en temps.

Comme on faisait, il y a longtemps.

Essayons de nous comprendre,

Et, peut-être revenir ensemble.

Bertrand Dupont

Ao

meu pai João Dian
pelo estímulo e compreensão

À

minha mãe Nair Moura Dian
pelo estímulo e amor

Ao

meu irmão Luiz Fernando Moura Dian
pelo apoio e incentivo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus que, com tanta competência, acompanhou meus passos conduzindo-me aos caminhos da harmonia.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela minha formação e em especial a Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ) pela oportunidade de cursar os cursos de Mestrado e Doutorado.

Ao Institut National de la Recherche Agonomique (INRA – Clermont – Ferrand – Theix, França) pela hospitalidade e possibilidade de realizar meu trabalho de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (CAPES/PDEE), pela bolsa de estudos durante o período de estágio na França.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado, na qualidade de amigo e orientador. Sou inteiramente grato por essa orientação que ultrapassa a tese, mas também pela dedicação, ensinamentos, estímulo, confiança e imensa amizade nos momentos de dificuldades e de dor.

À Sophie Prache que superando as barreiras do idioma, conseguiu ser uma excelente orientadora, brindando-me com importante colaboração, dosando as críticas com comentários de incentivo.

Ao Prof. Dr. Júlio César Damasceno e a sua família, pela sincera amizade, pelos bons momentos compartilhados na França, pelo companheirismo, bom humor, incentivando-me a prosseguir durante o ano de estudo e aprendizado na França.

Ao Prof. Dr. Clóves Cabreira Jobin, meu agradecimento especial pelo companheirismo, profissionalismo, solidariedade, incentivo, não medindo esforços para que eu conseguisse a Bolsa Sanduíche.

Ao Donato Andueza, pela amizade, companheirismo, compreensão, pelas ricas sugestões neste trabalho e pelo auxílio técnico no laboratório.

Aos técnicos de laboratório Juliane Pourrat e Michel Jestin, pelo auxílio técnico e pelo carinho com que me trataram durante minha estadia no INRA.

Ao Roland Jailler e toda a equipe do abatedouro do INRA (Julien, Patrice e Cédric) pelo auxílio no abate e coleta de dados.

Ao Mickael Bernard e Joel Ballet pelo auxílio na condução dos experimentos.

À Laurice da PPG-UEM que não mediu esforços para que eu conseguisse a bolsa de estudos, possibilitando meus estudos na França.

À minha namorada Greice pela compreensão e apoio em todos os momentos.

A todos meus amigos, que de maneira direta ou indireta ajudaram-me neste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

PAULO HENRIQUE MOURA DIAN, filho de João Dian e Nair Moura Dian, nasceu em Jaú, São Paulo, no dia oito de janeiro de 1979.

Em dezembro de 2001, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2002, iniciou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Nutrição de Ruminantes.

No dia 19 de fevereiro de 2004, submeteu-se à banca para defesa da dissertação.

Em março de 2004, reiniciou o Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Nutrição de Ruminantes.

Em 17 de janeiro de 2007, submeteu-se à banca para apresentação da Tese.

ÍNDICE

	Página
RESUMO GERAL.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
I - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
LITERATURA CITADA.....	8
II - OBJETIVOS GERAIS.....	11
III - Estudo da dose-resposta relacionando a concentração dos pigmentos carotenóides no sangue e no tecido adiposo aos níveis de ingestão de carotenóides em ovinos	
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	21
DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÕES.....	28
LITERATURA CITADA.....	28
IV - Validação e desenvolvimento da espectroscopia de reflectância visível e dos pigmentos carotenóides para autenticação da dieta em cordeiros	
RESUMO.....	42

ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS.....	48
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES.....	54
LITERATURA CITADA.....	54
V – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70

TABELAS DO APÊNDICE

	Página
Estudo da dose-resposta relacionando a concentração dos pigmentos carotenóides no sangue e no tecido adiposo aos níveis de ingestão de carotenóides em ovinos	
Tabela 1. Composição do concentrado fornecido aos cordeiros no experimento 1 (g/kg com base na matéria seca).....	31
Tabela 2. Características dos cordeiros no experimento 1.....	32
Tabela 3. Concentração de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ matéria seca) dos alimentos fornecidos no experimento 1.....	33
Tabela 4. Nível de ingestão médio diário de alfafa desidratada, concentrado, palha de aveia, carotenóides e luteína, concentração média de carotenóides no plasma ao abate e VAMI do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal no experimento 1.....	34
Tabela 5. Valores médios de luminosidade (L^*), intensidade de cor vermelha (a^*), e intensidade de cor amarela (b^*) do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal após 24h refrigeração no experimento 1.....	35
Validação e desenvolvimento da espectroscopia de reflectância visível e dos pigmentos carotenóides para autenticação da dieta em cordeiros	
Tabela 1. Composição botânica da pastagem consumida por cordeiros alimentados em pasto (%).....	65

Tabela 2. Composição do concentrado fornecido aos cordeiros confinados (g/kg).....	66
Tabela 3. Média das características (desvio padrão) dos cordeiros alimentados em pasto.....	67
Tabela 4. Média das características (desvio padrão) dos cordeiros confinados.....	68
Tabela 5. Concentração de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ MS) dos alimentos fornecidos aos cordeiros confinados.....	69

FIGURAS DO APÊNDICE

Página

Estudo da dose-resposta relacionando a concentração dos pigmentos carotenóides no sangue e tecido adiposo aos níveis de ingestão de carotenóides em ovinos

- Figura 1. Curva da dose-resposta relacionando a concentração de carotenóides no plasma ao abate ao nível médio diário de ingestão de carotenóides no experimento 1. Barras representam o erro padrão..... 36
- Figura 2. Curva da dose-resposta relacionando o valor absoluto médio da integral entre 450 e 510 nm (VAMI) para o tecido adiposo perirenal (■) e subcutâneo caudal (□) ao nível médio diário de ingestão de carotenóides no experimento 1. Barras representam o erro padrão..... 37
- Figura 3. Curva da dose-resposta relacionando o valor absoluto médio da integral entre 450 e 510 nm (VAMI) para o tecido adiposo perirenal (■) e subcutâneo caudal (□) ao nível de ingestão médio diário de luteína no experimento 1. Barras representam o erro padrão..... 38
- Figura 4. Curva da dose-resposta relacionando o valor absoluto médio da integral entre 450 e 510 nm (VAMI) para o tecido adiposo perirenal (■) e subcutâneo caudal (□) a concentração média de carotenóides no plasma ao abate. Barras representam o erro padrão..... 39

Figura 5. Curva da dose-resposta relacionando o valor absoluto médio da integral entre 450 e 510 nm (VAMI) para o tecido adiposo perirenal (símbolos sólidos) e subcutâneo caudal (símbolos abertos) a concentração média de carotenóides no plasma ao abate. Quadrados e triângulos referem-se ao experimento 1 e 2, respectivamente. Barras representam o erro padrão.....	40
Figura 6. Distribuição dos cordeiros de acordo com a concentração de carotenóides no plasma ao abate e valor absoluto médio da integral entre 450 e 510 nm (VAMI) para o tecido adiposo perirenal, no experimento 1: T0 (□), T250 (Δ), T500 (○), T750 (x), T1000 (▲) e T1250 (●) e no experimento 2 (■, cordeiros alimentados em pasto).....	41
Validação e desenvolvimento da espectroscopia de reflectância visível e dos pigmentos carotenóides para autenticação da dieta em cordeiros	
Figura 1. Distribuição da concentração de carotenóides no plasma de cordeiros em pasto e confinados.....	58
Figura 2. Espectro de reflectância médio entre 400 e 700 nm do tecido adiposo perirenal ao abate (a) ou após 24h de refrigeração (b). Cordeiros alimentados em pasto (—) e confinados (---).....	59
Figura 3. Espectro de reflectância médio entre 400 e 700 nm do tecido adiposo subcutâneo caudal ao abate (a) ou após 24h de refrigeração (b). Cordeiros alimentados em pasto (—) e confinados (---).....	60
Figura 4. Distribuição de cordeiros alimentados em pasto e confinados em diferentes classes de valores da integral do espectro de reflectância entre 450-510 nm. Medidas realizadas no tecido adiposo perirenal ao abate (a) ou após 24h de refrigeração (b).....	61
Figura 5. Distribuição de cordeiros alimentados em pasto e confinados em diferentes classes de valores da integral do espectro de reflectância entre 450-510 nm. Medidas realizadas no tecido adiposo subcutâneo caudal ao abate (a) ou após 24h de refrigeração (b).....	62

Figura 6. Proporção de cordeiros classificados corretamente usando o método 1 (valor da integral entre 450-510 nm) e método 2 (espectro de reflectância entre 400-700 nm) sobre o tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal ao abate. Símbolos sólidos e abertos referem-se ao método 1 e método 2, respectivamente. Perirenal Pasto, Caudal Pasto, Perirenal Confinamento e Caudal Confinamento referem-se a medidas realizadas no tecido adiposo perirenal ou subcutâneo caudal, em animais alimentados em pasto ou confinamento. *** Discriminação foi significativamente diferente a $P < 0,001$ entre ambos os métodos..... 63

Figura 7. Proporção de cordeiros classificados corretamente usando o método 1 (valor da integral entre 450-510 nm) e método 2 (espectro de reflectância entre 400-700 nm) sobre o tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal após 24h de refrigeração. Símbolos sólidos e abertos referem-se ao método 1 e método 2, respectivamente. Perirenal Pasto, Caudal Pasto, Perirenal Confinamento e Caudal Confinamento referem-se às medidas realizadas no tecido adiposo perirenal ou subcutâneo caudal, em animais alimentados em pasto ou confinamento. **, *** Discriminação foi significativamente diferente a $P < 0,01$ e $P < 0,001$ entre ambos os métodos..... 64

RESUMO

A carne e leite originários de ruminantes alimentados em pasto apresentam mais ácido linoléico conjugado (CLA), vitamina E, ácidos graxos ômega-3, beta-caroteno e vitamina A do que carne e leite de animais confinados. Por esta razão, existe a necessidade de um método capaz de diferenciar animais alimentados em pasto e confinados. No artigo 1, (experimento 1 e 2), o objetivo foi estudar: i – a curva da dose-resposta relacionando a concentração de pigmentos carotenóides no sangue e tecido adiposo aos níveis de ingestão de carotenóides em cordeiros; ii – como a incorporação de alfafa desidratada na dieta de cordeiros confinados poderia afetar o potencial de discriminação entre cordeiros em pasto e confinados, baseado em análises de carotenóides no plasma e tecido adiposo. No experimento 1, seis tratamentos foram comparados: fornecimento de 0, 250, 500, 750, 1000 e 1250 g de alfafa desidratada por dia, durante 60 dias antes do abate. Os animais foram alojados individualmente. Cada tratamento (T0, T250, T500, T750, T1000 e T1250) continha oito cordeiros machos Romanov x Berrichon. No experimento 2, um total de 33 cordeiros machos Romanov x Berrichon foram mantidos em pastagem nativa de boa qualidade por um período mínimo de 59 dias antes do abate. A concentração de carotenóides total do plasma foi medida ao abate por espectrofotometria. O espectro de reflectância e luminosidade (L^*), intensidade da cor vermelha (a^*), e intensidade da cor amarela (b^*) foram medidos após 24h de refrigeração no tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal. A integral do espectro de reflectância foi calculada entre 450 e 510 nm e admitiu-se o valor de reflectância de 510 nm como zero nm (início da zona de absorção de luz pelos carotenóides). As medidas de reflexão foram replicadas 5 vezes, a partir das

quais, foi calculado o valor absoluto médio da integral (VAMI). No artigo 2, o objetivo foi validar o potencial dos pigmentos carotenóides para traçar cordeiros em pasto e confinados, através do método de carotenóides no plasma e análises matemáticas do espectro de reflectância visível entre 450-510 nm e, também, explorar o potencial de discriminação usando todos os dados do espectro de reflectância entre 400-700 nm. Neste experimento, foram utilizados 307 cordeiros da raça Limousine. No artigo 1 (experimento 1), a concentração média dos carotenóides no plasma ao abate (CCPA) aumentou linearmente com a ingestão média diária de carotenóides (IMDC, $P < 0,001$). O VAMI do tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal aumentaram linearmente ($P < 0,001$) com a IMDC e CCPA. A CCPA foi maior para cordeiros alimentados em pasto (experimento 2) que em cordeiros do experimento 1 ($P < 0,001$). O uso combinado dos resultados obtidos no plasma e VAMI do tecido adiposo perirenal possibilitaram discriminar cordeiros alimentados em pasto, daqueles que receberam até 500 g de alfafa desidratada por dia. No artigo 2, o método da CCPA classificou corretamente 97,01% dos cordeiros. O potencial de classificação do método usando o espectro de reflectância entre 400-700 nm foi melhor que a 450-510 nm ($P < 0,0001$). A diferença entre tratamentos alimentares foi, entretanto, maior para o tecido adiposo perirenal que para o tecido adiposo subcutâneo caudal ($P = 0,0001$), e também maior para medidas realizadas após 24h de refrigeração que quando realizadas ao abate ($P < 0,0001$).

Palavras Chave: Carotenóides, Cordeiros, Plasma, Reflectância, Tecido adiposo

ABSTRACT

The meat and milk from grass-fed ruminants contains more conjugated linoleic acid (CLA), vitamin E, omega-3 fatty acids, beta-carotene, and vitamin A than meat and milk from grain-fed animals. Considering this there is a need for a method capable to differentiate between grass- and stall-fed animals. In article 1 (experiment 1 and 2), our objectives were to investigate (i) the dose-response curve relating carotenoid pigments concentration in blood and fat to carotenoid intake level in lambs, (ii) how far incorporating dehydrated alfalfa in stall-fed lambs diets could affect the discrimination reliability between concentrate-fed and grass-fed lambs based on plasma and fat carotenoid assay. In experiment 1, six treatments were compared in individually penned lambs: feeding 0, 250, 500, 750, 1000 and 1250 g of dehydrated alfalfa per day for 60 days before slaughter. Each treatment (T0, T250, T500, T750, T1,000 and T1,250) had eight male Romanov x Berrichon lambs. In experiment 2, a total of 33 male Romanov x Berrichon lambs were kept grazing a natural pasture maintained in a leafy green vegetative stage and offered ad libitum for at least 59 days until slaughter. Total carotenoids plasma content was measured at slaughter by spectrophotometry. Reflectance spectrum and lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) were measured after 24h of shrinkage in the perirenal and in the subcutaneous caudal fat. The translated spectrum was calculated between 450 and 510 nm (i.e., the range of light absorption by carotenoids). Reflectance measurement was replicated five times, from which we calculated the absolute value of mean integral (AVMI). In article 2, our objective was to validate in a large number of animals the use of plasma carotenoid concentration and mathematical analysis of reflectance spectrum of fat between 450 and 510 nm to discriminate pasture-fed and stall-fed lambs and, also, to explore the potential

use of reflectance spectrum of fat using the whole reflectance data in the zone from 400 to 700 nm. A total of 307 Limousine lambs were used for this experiment. In article 1 (experiment 1), plasma carotenoid concentration at slaughter (PCCS) increased linearly with mean daily carotenoid intake (MDCI, $P < 0.001$). Both subcutaneous caudal and perirenal fat AVMI increased linearly ($P < 0.001$) with MDCI and PCCS, the slope of the regression being greater for perirenal than for subcutaneous caudal fat ($P < 0.05$ and $P < 0.005$ respectively). PCCS was greater for lambs in the experiment 2 than the ones in the experiment 1 ($P < 0.001$). We established the dose-response curves relating PCCS and AVMI of subcutaneous and perirenal fat to carotenoid intake level. We showed that the combined use of plasma carotenoid concentration at slaughter and perirenal fat AVMI enabled to discriminate pasture-fed lambs from lambs receiving up to 500 g dehydrated alfalfa per d. In article 2, the plasma carotenoid concentration method correctly classified 97.01% of lambs. The performance of classification using the reflectance spectrum between 400-700 nm was better than at 450-510 nm ($P < 0.0001$). The difference between feeding treatments was, however, greater for perirenal than for subcutaneous caudal fat ($P = 0.0001$), and also greater for measurements made after 24h shrinkage than those obtained at 0 h ($P < 0.0001$).

Key Words: Carotenoids, Fat, Lambs, Plasma, Reflectance

I. INTRODUÇÃO

A traçabilidade é um importante instrumento de investigação da qualidade no agronegócio. Ela é definida pelo padrão internacional ISO 8402 como “a habilidade de traçar a história, a utilização ou a localização de uma entidade por meio de identificações registradas” (Charlier, 2003). Esta definição geral inclui a traçabilidade da origem e do processo desta entidade. Traçabilidade da origem refere-se à identidade do animal, sua raça e sua origem geográfica, que são freqüentemente importantes considerações na avaliação da qualidade do produto. Traçabilidade do processo refere-se aos sistemas de produção empregados, incluindo alimentação, os processos de transformação, conservação ou eventuais adulterações sobre os produtos. Esta definição de traçabilidade foi empregada em 1986, antes do aparecimento da encefalopatia espongiforme bovina (BSE). No princípio, ela foi obrigatória apenas dentro do processo geral de certificação de produtos de origem controlada. Entretanto, desde a crise da BSE, a traçabilidade é também usada como ferramenta para garantia da segurança alimentar.

Atualmente, tem aumentado o número de consumidores interessados em informações a respeito do modo de alimentação dos animais, sobretudo na imagem de “produto verde”, de animais mantidos em pasto, pois é considerado um modo de produção seguro e natural, respeitando o bem estar animal.

Ferramentas com o objetivo de traçar a alimentação dos herbívoros é o maior desafio para os cientistas. Recentemente, esforços têm sido feitos para desenvolver ferramentas analíticas para quantificar componentes específicos no produto ou no tecido animal que possam atuar como marcadores da alimentação fornecida aos animais.

1. Traçadores potenciais

Quatro propostas têm sido investigadas para gerar informações a respeito do alimento fornecido aos herbívoros: (i) biomarcadores em plantas, vindas diretamente da dieta (marcadores diretos), (ii) marcadores metabólicos, produzidos a partir do metabolismo animal (marcadores indiretos), (iii) marcadores físicos, a partir da relação de isótopos estáveis na dieta e (iv) marcadores globais, através da caracterização espectral dos tecidos e produtos de origem animal.

1.1. Biomarcadores em plantas

Os biomarcadores em plantas são componentes que não são sintetizados pelos animais e que sua ocorrência nos produtos de origem animal ou tecido animal é, inevitavelmente, devido ao alimento ingerido. Pigmentos carotenóides e os terpenos secundários são exemplos destes componentes. Estes micronutrientes são estocados na gordura animal após absorção e são também encontrados no leite e na carne. Micronutrientes solúveis em água, como os compostos fenólicos, recentemente mostraram utilidade na discriminação de leite obtido a partir de vacas alimentadas com 6 diferentes dietas (Besle et al., 2004). Outros componentes de plantas, como os fitenos (terpenóide de alto peso molecular), que têm sido encontrados no leite (Cerbulis et al., 1985) e tecido adiposo (Melton, 1990; Young et al., 1997) também poderiam ser utilizados como biomarcadores da dieta, mas ainda não receberam avaliação experimental.

1.1.1. Pigmentos carotenóides

A luteína é o único carotenóide estocado no tecido adiposo de ovinos e caprinos (Yang et al., 1992; Prache et al., 2003b), ao passo que bovinos também estocam o β -caroteno (Yang et al., 1992). Isto é de interesse porque a luteína está presente em altos níveis na forragem verde, com valores de 9-14 mg/100g matéria natural (Prache et al., 2003b), ao passo que cereais tubérculos e seus derivados não apresentam nada ou muito baixa concentração deste carotenóide (Wolter, 1988). Luteína poderia, desta forma, ser um excelente marcador para ovinos e caprinos, alimentados com forragens. Em contraste, a zeaxantina, o carotenóide abundante no milho, não é estocado por pequenos ruminantes (Yang et al., 1992; Prache et al., 2003b). Vale ressaltar que todos os processos de conservação de forragens alteram a concentração de carotenóides: comparando com o nível inicial em gramíneas frescas a concentração delas foi reduzida em 60% para forragens

desidratadas em sistema de ventilação forçada e silagem, 70% para feno seco em galpão e 80% a 90% para feno seco a campo (Wolter, 1988).

Vários autores comparando cordeiros alimentados exclusivamente em pasto e confinados com dieta a base de concentrado, observaram que os cordeiros em pasto acumularam 5 a 6 vezes mais carotenóides no sangue e 2,4 a 4,1 vezes mais luteína no tecido adiposo perirenal (Prache & Theriez, 1999, Priolo et al., 2002, Prache et al., 2003a, b). Nestes experimentos, cordeiros confinados ingeriram aproximadamente 3% de carotenóides de cordeiros em pasto (Prache et al., 2003a). Carotenóides no sangue foram utilizados com sucesso para discriminar cordeiros em pasto e confinados, embora alta variabilidade entre os animais foi observada (Prache et al., 2003a). Além disso, Prache & Theriez (1999) foram os pioneiros num método original para discriminar carcaças de ovinos alimentados em pasto vs. ovinos alimentados com concentrado, usando o espectro de reflectância do tecido adiposo na zona de absorção de luz pelos carotenóides (comprimento de onda entre 450-510 nm). Eles propuseram um índice baseado em análises matemáticas do espectro de reflectância do tecido adiposo para rastrear os ovinos alimentados em pasto. Este método foi utilizado com sucesso em ovinos (Prache & Theriez, 1999, Priolo et al., 2002, Prache et al., 2003a) e tem sido observado que este método é muito mais confiável quando a medida é feita no tecido adiposo perirenal em vez do tecido adiposo subcutâneo caudal (Priolo et al., 2002).

1.1.2. Terpenos

Terpenos formam uma grande classe de moléculas quase exclusivamente sintetizadas por plantas (monoterpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados). Terpenos variam amplamente de acordo com a família das plantas: a maioria das *Apiaceae* e certas *Asteraceae* e *Lamiaceae* contêm grande quantidade e ampla diversidade de terpenos, embora *Poaceae* contenha menores quantidades de terpenos e geralmente os mais comuns (Cornu et al., 2001b). Recentemente, os terpenos têm sido utilizados com sucesso para reconhecer a dieta animal e localizar a origem geográfica de animais em pasto (Cornu et al., 2001a), carne bovina; (Zeppa et al., 2003), em queijo; (Fernandez et al., 2003, Martin et al. 2005), em vacas leiteiras.

1.1.3. Compostos fenólicos

Forragens são ricas em compostos fenólicos e estes componentes têm recentemente mostrado serem muito promissores na traçabilidade da alimentação em ruminantes. Besle et al. (2004) alimentaram seis grupos de vacas com seis diferentes dietas: ricas em concentrado (65% da dieta), baseado em silagem de milho, silagem de centeio, feno de centeio, feno nativo de montanha e pastagem nativa + 15% de concentrado. Os compostos fenólicos contidos nestas dietas, determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), variou de 0,8 a 8 g/kg MS, sendo a pastagem nativa demasiadamente mais rica nestes compostos. Nos correspondentes leites, cerca de 60 compostos fenólicos foram detectados por CLAE. Quase metade foi encontrada em todos os leites, com cinco deles sendo predominantes. Os outros compostos, que foram específicos para uma dieta, podem ser utilizados para traçar a dieta fornecida aos herbívoros.

1.2. Marcadores indiretos

A composição de ácido graxo da carne e leite pode também ser uma fonte útil de informação sobre a alimentação fornecida aos animais. Os microrganismos dos ruminantes hidrogenizam os lipídios da dieta, resultando em aumento nos ácidos graxos saturados nos tecidos animais comparado com o perfil da dieta. Entretanto, partes dos ácidos graxos insaturados podem escapar da hidrogenação ruminal e a dieta pode afetar a composição de ácidos graxos dos tecidos e produtos de ruminantes (Wood & Enser, 1997; Wood et al., 2003; Aurousseau et al., 2004; Priolo et al., 2005). Os lipídios provenientes de forragem contêm altas proporções de ácido linolênico (LNA; 18:3 n-3), um composto que não é sintetizado pelos animais. Dietas baseadas em grãos contêm altas proporções de ácido linoléico (LA; 18:2 n-6). Assim, animais alimentados em pasto apresentam maiores proporções de ácido linolênico que animais confinados (Wood & Enser, 1997). Foi sugerido que a relação (n-6)/(n-3) pode ser útil para discriminar cordeiros em pasto e confinados (Wood et al., 2003; Aurousseau et al., 2004). Entretanto, deve ser notado que semente de linhaça é também muito rica em ácido linolênico e a inclusão dela no concentrado de animais confinados poderia afetar a discriminação baseada na composição de ácidos graxos do leite e carne (Scollan et al., 2001). Futuros experimentos são requeridos para solucionar esta dúvida.

1.3. Marcadores físicos

A dieta animal determina amplamente a composição da gordura do leite, e particularmente a relação de ácidos graxos insaturados e saturados. Portanto, a ressonância magnética nuclear ^{13}C tem sido utilizada para autenticar o leite de acordo com a dieta alimentar por determinação das proporções relativas de ácidos graxos poliinsaturados, monoinsaturados e saturados (Renou et al., 2004).

O espectrômetro de massas é outro método que tem sido utilizado com sucesso para autenticar a origem geográfica e regimes alimentares. A determinação da origem geográfica do leite e queijos tem sido estimada com sucesso medindo as relações de isótopos estáveis de oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$, ou seja, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) na água do leite, e concentração de isótopos de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$, ou seja, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) e carbono ($\delta^{13}\text{C}$, ou seja, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) em frações específicas do leite (Renou et al., 2004) ou de amostras de músculo (Piasenter et al., 2003, em cordeiros) produzidos em diferentes regiões da Europa. Renou et al. (2004) demonstraram que os valores do $\delta^{18}\text{O}$ no leite e carne foram afetados pela latitude e altitude, permitindo assim discriminar leite e carne produzidos em áreas montanhosas daqueles produzidos em regiões baixas.

1.4. Marcadores globais

Com a crescente sofisticação das técnicas instrumentais de análise química, impulsionada pela invasão de microprocessadores e microcomputadores no laboratório, técnicas de tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico tornaram-se necessárias. A análise de dados é uma parte essencial em todo experimento. Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, ganhando rapidamente popularidade e dando origem a uma nova disciplina, batizada de *Quimiometria*. O modelo estatístico dos métodos multivariados considera a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade muito maior de informações.

Cozzolino et al., (2002a,b) demonstraram que a caracterização espectral da carne (músculo *longissimus dorsi*) usando espectroscopia de reflectância visível e próxima do infravermelho (NIRS) podem ser utilizadas para diferenciar amostras de carne de bovinos originários de dois sistemas de alimentação (dieta baseada em 100% de pastagem vs. dieta baseada em silagem de milho). Amostras de carne foram copiadas no aparelho NIRS em

modo de reflectância. A discriminação dos músculos foi realizada por análises de componentes principais e pelo método “Soft Independent Modelling of Class Analogy”. Análises quantitativas da informação óptica mostraram diferenças nos músculos, possibilitando a discriminação dos dois sistemas de alimentação. Também, Osório et al., (2006), discriminaram corretamente carcaças de cordeiros alimentados com leite integral ou sucedâneo, usando o NIRS, a partir de amostras do tecido adiposo perirenal.

Estes primeiros resultados indicam que é possível discriminar dietas alimentares contrastantes a partir de componentes específicos encontrados sobre os produtos e tecidos animais. Entretanto, a maioria destes estudos utilizando traçadores, mostra uma grande variabilidade da resposta animal, o que torna indispensável uma validação sobre um grande número de animais para pesquisar as fontes de variação dos métodos e quantificar os efeitos da variabilidade individual sobre a autenticação da dieta. O estágio de maturidade das plantas também pode afetar o nível de ingestão dos traçadores de interesse, assim como a disponibilidade de forragem e a suplementação em pastagem, que influenciam na ingestão de forragem, afetando, assim, a ingestão dos traçadores. Desta forma, é necessário estudar a resposta entre a quantidade de traçadores ingeridos pelo animal e a concentração sobre os tecidos e produtos de origem animal. Também, o fornecimento de grandes quantidades de volumosos ricos em carotenóides para animais confinados, como a alfafa desidratada, por exemplo, pode afetar o potencial de discriminação entre animais confinados e mantidos em pasto, baseado na concentração destes pigmentos no plasma e tecido adiposo.

A pecuária no Brasil é uma atividade altamente competitiva, apresentando enorme potencial de produção de carne em pastagens, deve-se a extensão da área territorial e condições climáticas favoráveis. As pastagens assumem dois aspectos fundamentais na pecuária brasileira. O primeiro é que elas viabilizam a competitividade brasileira, e a segunda, é o fato de elas possibilitarem o atendimento da grande demanda mundial por alimento produzido de forma natural, com respeito ao ambiente e aos animais. É esse cenário que deverá nortear a reestruturação da cadeia produtiva de carne bovina brasileira e o fortalecimento dos sistemas de produção de bovinos de corte. Atualmente, pouco esforço no sentido de promover nosso produto no exterior vem sendo feito. Os exportadores brasileiros terão que começar a preocupar-se em divulgar o produto brasileiro se quiser aumentar ou até mesmo manter o atual volume exportado, principalmente com a retomada

das exportações de importantes concorrentes do Brasil, como a Austrália e a Argentina. Após o surgimento da “vaca louca” na Europa, aspectos intrínsecos de qualidade que eram importantes passaram a dar lugar para outros até então pouco valorizados. O bem estar animal, os alimentos consumidos, os medicamentos utilizados, dentre outros, passaram a exercer uma maior importância nas exigências dos consumidores principalmente de países desenvolvidos.

LITERATURA CITADA

- Aurousseau, B., Bauchart, D., Calichon, E., Micol, D., & Priolo, A. (2004). Effect of grass or concentrate feeding systems and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the m. *Longissimus thoracis* of lambs. *Meat Science*, 66(3), 531–541.
- Besle, J. M., Lamaison, J. L., Pradel, P., Fraisse, D., Viala, D., & Martin, B. (2004). Les flavonoïdes, des fourrages au lait. In: Proc. 11^{èmes} Renc. Rech. Rumin., Paris, France, (pp. 67–70).
- Cerbulis, J., Flanagan, V. P., & Farrell, J. H. M. (1985). Composition of the hydrocarbon fraction of goats' milk. *Journal of Lipid Research*, 26, 1438–1443.
- Charlier, C. (2003). La traçabilité comme un standard de production. *Economie Rurale*, 275, 5–18.
- Cornu, A., Kondjoyan, N., Begnaud, F., Micol, D., Renou, J. P., Bardagué, J. L., (2001a). Les terpènes des viandes, traceurs de l'alimentation et de l'origine géographique des animaux. In: Proc. 8^{èmes} Renc. Rech. Rumin., Paris, France, pp. 61.
- Cornu, A., Carnat, A. P., Martin, B., Coulon, J. B., Lamaison, J. L., Berdagué, J. L. (2001b). Solid phase microextraction of volatile components from natural grassland plants. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 203–209.
- Cozzolino, D., De Mattos, D., & Vaz Martins, D. (2002a). Visible/near infrared reflectance spectroscopy for predicting composition and tracing system of production of beef muscle. *Animal Science*, 74, 477–484.
- Cozzolino, D., Vaz Martins, D., & Murray, I., (2002b). Visible and near infrared spectroscopy of beef *longissimus dorsi* muscle as a means of discriminating between pasture and corn silage feeding regimes. *Journal Near Infrared Spectroscopy*, 10, 187–193.
- Fernandez, C., Astier, C., Rock, E., Coulon, J. B., & Berdagué, J. L. (2003). Characterization of milk by analysis of its terpene fraction. *Journal Food Science and Technology*, 38, 445–451.
- Martin, B., Cornu, A., Kondjoyan, N., Ferlay, A., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Rock, E., Chilliard, Y., Coulon, J. B., & Berdagué, J. L. (2005). Milk indicators for recognizing the types of forages eaten by dairy cows. In: Hocquette, J.F., Gigli, S. (Eds.),

- Proceedings of the European Association of Animal Production Publication on Indicators of Milk and Beef Quality, vol. 112. Bled, Slovenia, (pp. 127–136).
- Melton, S. L. (1990). Effects of feeds on flavor of red meat: a review. *Journal of Animal Science*, 68, 4421-4435.
- Osório, M. T., Zumalacárregui, J. M., Prieto, N., Giráldez, F., J., Andrés, S., & Mateo, J. (2006). Differentiation between carcasses from suckling lambs reared with ewe milk or milk replacers by near infrared reflectance spectroscopy of perirenal fat, *Small Ruminant Research*, doi:10.1016/j.smallrumres.2006.10.011.
- Piasentier, E., Valusso, R., Camin, F., & Versini, G. (2003). Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science*, 64(3), 239–247.
- Prache, S., & Theriez, M., 1999. Traceability of lamb production systems: carotenoids in plasma and adipose tissue. *Animal Science*, 69, 29–36.
- Prache, S., Priolo, A., & Grolier, P. (2003a). Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: its significance for the traceability of grass feeding. *Journal of Animal Science*, 81, 360–367.
- Prache, S., Priolo, A., & Grolier, P. (2003b). Effect of concentrate finishing on the carotenoid content of perirenal fat in grazing sheep: its significance for discriminating grass-fed, concentrate fed and concentrate-finished grazing lambs. *Animal Science*, 77, 225–233.
- Priolo, A., Prache, S., Micol, D., & Agabriel, J. (2002). Reflectance spectrum of adipose tissue to trace grass feeding in sheep: influence of measurement site and shrinkage time after slaughter. *Journal of Animal Science*, 80, 886–891.
- Priolo, A., Bella, M., Lanza, M., Galofaro, V., Biondi, L., Barbagallo, D., Ben Salem, H., & Pennisi, P. (2005). Carcass and meat quality of lambs fed fresh sulla (*Hedysarum coronarium* L.) with or without polyethylene glycol or concentrates. *Small Ruminant Research*, 59(2-3), 281-288
- Renou, J. P., Deponge, C., Gachon, P., Bonnefoy, J. C., Coulon, J. B., Garel, J. P., Vérité, R., & Ritz, P. (2004). Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. *Food Chemistry*, 85, 63-66.
- Scollan, N. D., Choi, N. J., Kurt, E., Fisher, A. V., Enser, M., & Wood, J.D. (2001). Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *British Journal of Nutrition*, (85), 115–124.
- Wolter, R., (1988). Alimentation vitaminique. In *Alimentation de bovins, ovins et caprins*, (pp. 113-120). Institut National de la Recherche Agronomique, France.
- Wood, J. D., & Enser, M. (1997). Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *British Journal of Nutrition*, 78, S49–S60.
- Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R., & Enser, M. (2003). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66(1), 21–32.
- Yang, A., Larsen, T. W., & Tume, R. K., (1992). Carotenoid and retinal concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoids transport in sheep, goats and cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 43, 1809-1817.
- Young, O. A., Berdagué, J. L., Viallon, C., Rousset-Akrim, S., & Theriez, M. (1997). Fat-borne volatiles and sheepmeat odour. *Meat Science*, 45(2), 183–200.

Zeppa, G., Giordano, M., Lombardi, G., & Gerbi, V. (2003). Use of terpene profiles for the mountain pastures characterization. In: Proceedings of the First Joint Seminar of the FAO-CIHEAM Sheep and Goat Nutrition and Mediterranean Pasture Sub-Networks 'Sustainable Grazing, Nutritional Utilization and Quality of Sheep and Goat products', Granada, Spain, p. 106.

II. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi: (i) determinar a curva da dose-resposta relacionando a concentração de pigmentos carotenóides no sangue e no tecido adiposo aos níveis de ingestão de carotenóides em cordeiros; (ii) verificar como a incorporação de alfafa desidratada na dieta de cordeiros confinados poderia afetar o potencial de discriminação entre cordeiros em pasto e confinados, baseado em análises de carotenóides no plasma e no tecido adiposo; (iii) validar o potencial dos pigmentos carotenóides sobre um grande efetivo de animais para traçar cordeiros em pasto e confinados, através dos níveis de carotenóides no plasma e análises matemáticas do espectro de reflectância entre 450-510 nm e; (iv) avaliar o potencial de discriminação utilizando todos os dados do espectro de reflectância entre 400-700 nm.

III. Estudo da dose-resposta relacionando a concentração dos pigmentos carotenóides no sangue e no tecido adiposo aos níveis de ingestão de carotenóides em ovinos

RESUMO: Este estudo foi conduzido para descrever a curva da dose-resposta relacionando a concentração de pigmentos carotenóides no plasma e tecido adiposo de acordo com os níveis de ingestão de carotenóides em ovinos, e investigar como a incorporação de alfafa desidratada na dieta poderia afetar o potencial de discriminação entre ovinos com dietas a base de concentrado e pastagem, baseado em análises no plasma e no tecido adiposo. No experimento 1, seis tratamentos foram comparados em ovinos confinados individualmente: fornecimento de 0, 250, 500, 750, 1000 e 1250 g de alfafa desidratada por dia durante 60 dias antes do abate. Cada tratamento (T0, T250, T500, T750, T1000 e T1250) continha oito cordeiros machos Romanov x Berrichon com peso médio inicial de 24,8 kg (e.p. 2,60). Todos os cordeiros receberam palha de aveia à vontade e os cordeiros T0 a T1000 receberam um concentrado livre de vegetais verdes, sendo o fornecimento regulado para obter taxas de crescimento similares entre os tratamentos. No experimento 2, um total de 33 cordeiros machos Romanov x Berrichon com peso médio inicial de 14,2 kg (e.p. 2,34) foram mantidos em pastagem nativa de boa qualidade por um período mínimo de 59 dias antes do abate. A concentração de carotenóides do plasma foi medida ao abate por espectrofotometria. O espectro de reflectância e luminosidade (L^*), intensidade da cor vermelha (a^*), e intensidade da cor amarela (b^*) foram medidos após 24h de refrigeração no tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal. Os espectros foram transcritos da reflectância 0 a 510 nm e a integral do espectro transcrito foi calculada entre 450 e 510 nm (zona de absorção de luz pelos carotenóides). As medidas de reflectância foram repetidas cinco vezes, a partir das quais foi calculado o valor absoluto médio da integral (VAMI). No experimento 1, a concentração dos carotenóides no plasma ao abate (CCPA) aumentou linearmente com a ingestão média diária de carotenóides (IMDC, $P < 0,001$). O VAMI do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal aumentaram linearmente ($P < 0,001$) com a IMDC e CCPA, a inclinação da regressão sendo maior para o tecido adiposo perirenal ($P < 0,005$) que para o subcutâneo caudal ($P < 0,05$). A CCPA foi maior para cordeiros do experimento 2 que para cordeiros do experimento 1 ($P < 0,001$). Foram estabelecidas curvas de dose-resposta relacionando a CCPA e VAMI do tecido adiposo

subcutâneo caudal e perirenal ao nível de ingestão de carotenóides. Com o uso combinado da CCPA e VAMI do tecido adiposo perirenal, foi possível discriminar cordeiros alimentados em pasto daqueles que receberam até 500 g de alfafa desidratada por dia.

Palavras Chave: Alfafa, Carcaça, Carotenóides, Ovinos, Reflectância, Tecido Adiposo

A dose-response study relating carotenoid pigments concentration in blood and fat to carotenoid intake level in sheep

ABSTRACT: This study was conducted to describe the dose-response curve relating carotenoid pigments concentration in plasma and fat to carotenoid intake level in sheep, and to investigate how far dehydrated alfalfa incorporation in diet could affect the discrimination reliability between concentrate-fed and pasture-fed lambs based on plasma and fat carotenoid assay. In experiment 1, six treatments were compared in individually penned lambs: feeding 0, 250, 500, 750, 1,000 and 1,250 g of dehydrated alfalfa per d for 60 d before slaughter. Each treatment (T0, T250, T500, T750, T1,000 and T1,250) had 8 male Romanov x Berrichon lambs with an initial average BW of 24.8 kg (s.e. 2.60). All lambs received oats straw ad libitum and T0 to T1,000 lambs received a concentrate free of green vegetative matter being the supply regulated to produce similar growth patterns in all treatments. In experiment 2, a total of 33 male Romanov x Berrichon lambs were kept grazing a natural pasture maintained in a green vegetative stage and offered ad libitum for at least 59 d before slaughter. Initial BW when turning out to pasture was 14.2 kg (s.e. 2.34). Plasma carotenoid concentration was measured at slaughter by spectrophotometry. Reflectance spectrum, lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) were measured after 24h of shrinkage in the subcutaneous caudal and perirenal fat. The spectra were translated to 0 reflectance at 510 nm and the integral of translated spectrum was calculated between 450 and 510 nm (i.e., the range of light absorption by carotenoids). Reflectance measurement was replicated 5 times, from which it was calculated the absolute value of mean integral (AVMI). In experiment 1, plasma carotenoid concentration at slaughter (PCCAS) increased linearly with mean daily carotenoids intake (MDCI, $P < 0.001$). Both subcutaneous caudal and perirenal fat AVMI increased linearly ($P < 0.001$) with MDCI and PCCAS, the slope of regression was greater for perirenal than for subcutaneous caudal fat ($P < 0.05$ and $P < 0.005$ respectively). PCCAS was greater for lambs of experiment 2 than the ones of either treatment in the experiment 1 ($P < 0.001$). We established the dose-response curves relating PCCAS and AVMI of subcutaneous and perirenal fat to carotenoid intake level. We showed that the combined use of plasma carotenoid concentration at

slaughter and perirenal fat AVMI enabled to discriminate pasture-fed lambs from lambs receiving up to 500 g dehydrated alfalfa per d.

Key Words: Alfalfa, Carcasses, Carotenoids, Fat, Reflectance, Sheep

INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes fatores de produção que afetam a composição do leite e da carne em bovinos, ovinos e caprinos é a dieta animal. Estes efeitos devem-se a componentes específicos que são diretamente transferidos do alimento para o produto final ou transformados ou produzidos pelos microrganismos ruminal ou pelo metabolismo animal em resposta a dietas específicas. Por sua vez, alguns destes componentes podem ser utilizados como marcadores para autenticar a dieta (Prache et al., 2005; Martin et al., 2005). Os pigmentos carotenóides são exemplos destes componentes. Eles estão envolvidos em propriedades nutricionais e sensoriais dos produtos de herbívoros e têm mostrado recentemente serem úteis na autenticação da dieta, particularmente para distinguir animais com alimentação a base de pastagem daqueles alimentados à base de grãos (Prache e Theriez, 1999; Prache et al., 2002; Prache et al., 2003ab; Nozière et al., 2006a; Serrano et al., 2006). Entretanto, a concentração de carotenóides nos tecidos animais e produtos pode variar rapidamente de acordo com seu fornecimento na dieta. O propósito deste estudo foi: (i) estabelecer uma curva da dose-resposta associando a concentração de carotenóide no sangue e tecido adiposo de acordo com o nível de ingestão de carotenóides em ovinos, usando cordeiros confinados individualmente e recebendo níveis controlados de alfafa desidratada, e (ii) investigar como a incorporação de alfafa desidratada na dieta de cordeiros confinados poderia reduzir a discriminação entre cordeiros alimentados a base de concentrado e forragem, baseado na concentração de carotenóides no plasma e tecido adiposo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na fazenda experimental do INRA de Clermont-Ferrand, Theix, França. Os animais foram manejados por pessoas especializadas que buscavam o bem-estar animal de acordo com a Diretriz da União Européia No. 609/1986.

Modelo Experimental

Experimento 1. Seis níveis de alfafa desidratada foram comparados: 0, 250, 500, 750, 1000 e 1250 g de alfafa desidratada por dia. Cada tratamento (T0, T250, T500, T750, T1000 e

T1250) continha oito cordeiros Romanov x Berrichon, individualmente confinados, sendo a dieta experimental fornecida por 60 dias antes do abate. Quarenta e oito cordeiros foram classificados em oito blocos de acordo com o peso ao nascer e o ganho médio diário entre o nascimento e o começo do experimento. Eles foram então escolhidos ao acaso a partir dos blocos a um dos seis tratamentos. O peso médio ao nascer e o ganho médio diário entre o nascimento e o começo do experimento foram 4,11 kg (e.p. 0,941) e 309 g/d (e.p. 51,0); os cordeiros pesavam 24,8 kg (e.p. 2,60) no começo do experimento.

Os cordeiros foram alojados em curral do nascimento ao abate. Eles nasceram em Novembro de 2004 e receberam concentrado comercial *ad libitum* a partir de 3 semanas de idade até o começo do experimento. A composição do concentrado oferecido está apresentada na Tabela 1. As mães dos cordeiros também foram mantidas confinadas e elas receberam feno de pastagem natural da montanha *ad libitum* e concentrado comercial livre de vegetais verdes. Os cordeiros foram progressivamente desmamados a partir de Dezembro até o começo do experimento. A duração da suplementação de alfafa foi similar para todos os cordeiros para evitar problemas na intensidade de fixação do pigmento.

Para permitir diferentes datas de abate e otimizar o trabalho no abatedouro, o experimento começou em 06 de Janeiro, 08 de Janeiro, 13 de Janeiro e 15 de Janeiro de 2005 com 12 animais para cada data. Durante o experimento, cordeiros nos tratamentos T0 a T1000 receberam um concentrado comercial para atingir padrões de crescimento similares entre os seis tratamentos. O nível de alimentação dos cordeiros T0, T250, T500, T750 e T1000 foi ajustado toda semana para atingir um padrão de crescimento similar ao cordeiro T1250 do mesmo bloco. Assim, os cordeiros poderiam ser abatidos com peso corporal e nível de gordura similares em todos os grupos experimentais, desse modo, evitando problemas com os níveis de gordura sobre a concentração de carotenóides no tecido adiposo (Prache et al, 2003b). O concentrado oferecido no experimento 1 foi similar ao fornecido previamente a partir de 3 semanas de idade. Durante as primeiras 2 semanas do experimento, os cordeiros T1250 também receberam 100 g por dia do concentrado comercial (base na matéria natural) para permitir uma adaptação durante a transição alimentar.

Palha de aveia foi fornecida *ad libitum* para todos os cordeiros. Alfafa desidratada e palha de aveia foram oferecidas de manhã para assegurar o consumo do nível de alfafa

desidratada desejado, e o concentrado foi oferecido à tarde. Os comedouros foram esvaziados toda manhã e as sobras de alimentos foram pesadas, anotadas e descartadas diariamente. Amostras de alfafa oferecida, concentrado e palha de aveia foram coletadas duas vezes por semana para estimativas de matéria seca e concentração de carotenóides.

Experimento 2. Trinta e três cordeiros machos Romanov x Berrichon, nascidos em Março de 2005 foram utilizados. Eles pastejaram *ad libitum*, sem suplementação, de 24 de Abril até o abate, uma pastagem nativa manejada para manter boa qualidade de forragem. A composição botânica da pastagem foi (base na matéria seca) *Lolium perenne* (29,8%), *Dactylis glomerata* (28,6%), *Festuca arundinacea* (20,7%), *Taraxacum officinale* (10,0%), *Bromus sterilis* (9,9%), *Trifolium repens* (0,7%), e *Ranunculus macrophyllus* (0,3%). Os cordeiros pesavam 14,2 kg (e.p. 2,34) e uma média de 38 d (e.p. 1,4) quando iniciaram o pastejo. A maioria destes cordeiros foi oriunda de partos gemelares. A duração do período de pastagem variou de 59 a 136 dias. Os cordeiros foram desmamados no dia 28 de junho. Os animais foram abatidos quando atingiram nível satisfatório de gordura que foi manualmente avaliado por técnicos experientes de acordo com o método de Russel et al. (1969), com o objetivo de obter a espessura do tecido adiposo subcutâneo caudal da carcaça fria variando de 2 a 3 mm.

Em ambos os experimentos, água e blocos de sal estavam sempre disponíveis. Os blocos de sal continham (g/kg, com base na matéria seca) 60 Ca, 20 P, 10 Mg, 280 Na, 17,5 Zn, 1,5 Fe, 5,5 Mn, 0,03 Co, 0,03 I, e 0,01 de Se.

Procedimentos de Abate. Todos os cordeiros de ambos os experimentos foram abatidos. No experimento 1, os cordeiros foram alimentados com a dieta experimental durante 60 dias e após, abatidos em quatro sessões de abate, nos dias 7, 9, 14 e 16 de março de 2005. Os cordeiros foram abatidos de manhã e não foram alimentados no dia do abate. No experimento 2, os cordeiros foram abatidos entre 22 de junho e 7 de setembro de 2005. Os animais foram transportados ao abatedouro por caminhão, localizado a 500 m do confinamento e da pastagem. Imediatamente após a chegada dos cordeiros, estes foram abatidos por corte da carótida e da jugular. Após o abate, as carcaças foram colocadas em uma sala refrigerada a 4°C durante 24h. As carcaças foram sempre mantidas no escuro, uma vez que os carotenóides são sensíveis à luminosidade.

Medidas

Concentração de Carotenóides nos Alimentos. Carotenóides da alfafa, concentrado e palha de aveia foram extraídos usando o procedimento descrito por Cardinault et al. (2006). Componentes lipofílicos de 50 mg dos alimentos triturados e liofilizados foram primeiro extraídos com acetona e então purificados com dietil éter, contendo echinenona como padrão interno. Após saponificação e lavagem com água, os carotenóides foram analisados por CLAE usando o método descrito por Lyan et al. (2001). O cromatógrafo líquido utilizado foi um Waters Alliance 2996 System com detector de fotodiodo monitorado entre 280 e 600 nm. Carotenóides foram separados em uma coluna Nucleosil 150 x 4,6 mm, RP C18,3 μm acoplada com uma coluna Vydac TP 54 250 x 4,6 mm, RP C18,5 μm (Interchin, Montluçon, France). O software Millennium 32 a partir do Waters SA (Saint Quentin em Yvelines, France) foi utilizado como instrumento controle, para aquisição e processamento dos dados. A detecção do comprimento de onda para os carotenóides foi a 450 nm, e os compostos foram identificados comparando tempos de retenção e análises espectrais com aquele do padrão puro (> 95%). As concentrações de cada composto foram calculadas usando curvas de padrão externo e foram ajustadas por porcentagem de recuperação do padrão interno adicionado.

Concentração de Carotenóides no Plasma. Amostras de sangue, para estimação da concentração de carotenóides no plasma foram coletadas de todos os cordeiros ao abate. Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular de todos os cordeiros às 08:00 h. O plasma foi estocado a -20°C até o dia da análise. Extração de carotenóides do plasma foi realizada dentro de 3 meses após amostragem.

Estimação bruta dos carotenóides totais foi determinada em um espectrofotômetro usando o seguinte método: A partir de 3,0 mL de plasma foi adicionado 2,0 mL de água destilada e a proteína foi precipitada com 4,0 mL de etanol. Os carotenóides foram então extraídos com 4,0 mL de hexano. Absorção da camada superior obtida após centrifugação a 5000 rpm por 5 min foi medida entre 400 e 600 nm usando um espectrofotômetro Kontron Uvikon 860 (Kontron Instruments S.A., Montigny-le-Bretonneux, France). A concentração de carotenóides totais foi calculada por absorção máxima (Karijord, 1978), assumindo o valor de 2.500 para o coeficiente de extinção $E_{1\%}$ (Patterson, 1965; Karijord, 1978) e levando em consideração a diluição da amostra original. Cuidados foram tomados durante

tudo o procedimento experimental e analítico para proteger as amostras da luz natural (tubos de sangue foram identificados e envolvidos por papel alumínio para evitar contato com a luz).

Características dos Animais ao Abate. Os cordeiros foram pesados antes do abate. Peso da carcaça, peso do tecido adiposo perirenal e espessura do tecido adiposo subcutâneo caudal foram determinados após 24h de refrigeração. O tecido adiposo perirenal e rins foram removidos juntos da carcaça e, então, separados usando lâmina cortante para pesagem do tecido adiposo separadamente. A pesagem da carcaça fria foi realizada antes da remoção destes itens. A espessura do tecido adiposo subcutâneo caudal foi medida fazendo duas incisões, em que o primeiro corte teve extensão de 4 cm no sentido ventro-lateralmente da linha médio dorsal na altura da última costela e, no limite do corte, estendeu-se outro corte de 4 cm no sentido cranial, sendo que a aba de gordura foi elevada na intercessão das incisões e a gordura subcutânea medida com paquímetro, com cuidado de não produzir deformação (Fisher e de Boer, 1994).

Espectro de Reflectância do Tecido Adiposo Perirenal e Subcutâneo Caudal. O espectro de reflectância do tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal a comprimentos de onda entre 700 e 400 nm e coloração expressas como luminosidade (L^*), intensidade da cor vermelha (a^*), e intensidade da cor amarela (b^*) (CIE, 1986) foram determinadas usando um espectrofotômetro MINOLTA CM-2002 (iluminante D_{65} , angulo observado 10°). Este instrumento mede a proporção de luz refletida a cada 10 nm. Medidas foram feitas após 24h de refrigeração da carcaça. Para o tecido adiposo perirenal, uma superfície plana foi obtida com uma lâmina, para permitir uma perfeita aderência do tecido adiposo no leitor do aparelho (Priolo et al., 2002b). Para cada local de deposição do tecido adiposo, foram realizadas cinco medidas.

Análises dos Dados. O espectro de reflectância entre 510 e 450 nm foi transcrito e foi admitido o valor de reflectância de 510 nm como zero (**VR**). Sobre o espectro transcrito, o valor da integral entre 450 e 510 nm ($I_{450-510}$) foi calculado como segue:

$$I_{450-510}, VR.nm = [(VR_{450} / 2) + VR_{460} + VR_{470} + VR_{480} + VR_{490} + VR_{500} + (VR_{510} / 2)] \times 10$$

O valor da integral foi determinado a partir de cinco medidas. Os valores da média da integral foram sempre negativos; desta forma, foi utilizado o valor absoluto médio da integral (**VAMI**). A variância do VAMI e concentração dos carotenóides no plasma foram

estabilizadas usando transformação logarítmica. Os dados foram submetidos à análise de variância usando o método GLM do SAS (SAS, 1999) para examinar o efeito do tratamento experimental e blocos, e usando o teste de comparação múltipla de tratamentos (Student-Newman-Keuls Multiple Range Test) para comparações pareadas. Foram utilizados contrastes ortogonais para examinar se as respostas da concentração dos carotenóides no plasma ao abate (**CCPA**, $\mu\text{g/L}$), do VAMI e do valor b^* do tecido adiposo do tratamento alimentar teve uma relação linear ou curvilínea ao nível de ingestão médio diário de carotenóides (**IMDC**, mg). Como a luteína é o único carotenóide estocado no tecido adiposo de ovinos (Yang et al., 1992; Prache et al., 2003b), foi examinado se a resposta do VAMI e do valor b^* do tecido adiposo do tratamento alimentar teve uma relação linear ou curvilínea ao nível de ingestão médio diário de luteína (**IMDL**, mg). Análises de regressão do VAMI e do valor b^* do tecido adiposo sobre a CCPA foram realizadas usando o procedimento GLM do SAS (SAS, 1999).

RESULTADOS

As características dos animais no experimento 1 estão sumarizadas na Tabela 2. O ganho médio diário do nascimento ao abate, idade ao abate e peso do tecido adiposo perirenal não diferiram entre os tratamentos ($P = 0,254$, $0,083$ e $0,076$, respectivamente). O peso dos animais diferiu entre os tratamentos ($P = 0,005$), mas o peso da carcaça não diferiu ($P = 0,527$). A espessura do tecido adiposo subcutâneo caudal foi menor no T1000 que no T0 ($2,1$ vs $3,5$ mm, $P < 0,05$). Todas estas características variaram significativamente entre os blocos de cordeiros.

No experimento 2, o peso corporal médio e idade média ao abate dos cordeiros foi $40,1$ kg (e.p. $4,95$) e 153 d (e.p. $22,3$), respectivamente. O ganho médio diário do nascimento ao abate foi 240 g/d (e.p. 38), ainda que a maioria dos cordeiros foi oriunda de partos gemelares, o que demonstra que a qualidade e disponibilidade da pastagem foram favoráveis à expressão da ingestão voluntária. O peso da carcaça, peso do tecido adiposo perirenal e espessura do tecido adiposo subcutâneo caudal foram, em média, $17,34$ kg (e.p. $2,569$), $0,220$ kg (e.p. $0,1103$) e $2,2$ mm (e.p. $0,75$), respectivamente.

Nível de Ingestão de Carotenóides

No experimento 1, a concentração de carotenóides na alfafa desidratada, concentrado e palha de aveia foram 280,6; 2,4 e 2,0 µg/g MS, respectivamente (Tabela 3). Luteína foi o carotenóide predominante (71,3%, 91,3% e 100% do total de pigmentos carotenóides na alfafa desidratada, concentrado e palha de aveia, respectivamente). Ingestão média diária de alfafa desidratada foi 99,2%, 99,0%, 99,9%, 98,1% e 95,8% dos níveis designados para os tratamentos T250, T500, T750, T1000 e T1250, respectivamente (Tabela 4). As diferenças entre os níveis atuais e determinados ocorreram principalmente no começo do experimento. A IMDC e IMDL aumentaram linearmente ($P < 0,001$) com o nível de ingestão médio diário de alfafa desidratada.

Concentração de Carotenóides no Plasma

No experimento 1, a CCPA variou de 0 a 6, 4 a 14, 12 a 39, 13 a 64, 40 a 65, e de 28 a 95 µg/L para os tratamentos T0, T250, T500, T750, T1000 e T1250, respectivamente, e foi afetado pelo tratamento ($P < 0,001$, Tabela 4), mas não pelos blocos de animais. A CCPA foi maior para T500, T750, T1000 e T1250 que para T0 e T250. A resposta da CCPA ao tratamento alimentar teve uma relação linear com a IMDC ($P < 0,001$, Figura 1), sem nenhum efeito quadrático ($P = 0,784$), a equação de regressão para a média dos dados de 8 animais sendo:

$$\text{CCPA} = 0,38 \text{ (e.p. 2,501)} + (0,2052 \text{ (e.p. 0,01364)}) \times (\text{IMDC}) \quad (1)$$

Onde $r^2 = 0,98$, desvio padrão residual (d.p.r.) = 3,387, $n = 6$

O intercepto não foi diferente de 0 ($P = 0,885$).

No experimento 2, a CCPA média foi 112 µg/L (e.p. 9,6), variando de 43 a 258 µg/L. A CCPA foi maior para cordeiros do experimento 2 que para qualquer um dos tratamentos do experimento 1 ($P < 0,001$). Não foi observada sobreposição de valores para a CCPA entre cordeiros em pasto no experimento 2 e aqueles que receberam até 500 g de alfafa desidratada por dia no experimento 1. Metade dos cordeiros T750 tiveram valores maior que 43 µg/L. A maioria dos T1000 e T1250 (13 dos 16 cordeiros) tiveram valores maior que 43 µg/L, dentro da amplitude observada para cordeiros em pasto.

Espectro de Reflectância entre 450 e 510 nm e Cor do Tecido Adiposo

No experimento 1, o VAMI do tecido adiposo subcutâneo caudal variou de 114,04 a 236,40, 131,56 a 269,50, 160,14 a 286,38, 133,61 a 325,39, 218,50 a 381,41 e 217,84 a

390,82 unidades para cordeiros T0, T250, T500, T750, T1000 e T1250, respectivamente. O VAMI do tecido adiposo perirenal variou de 78,94 a 213,65, 110,75 a 269,20, 162,63 a 266,45, 231,64 a 354,45, 263,80 a 373,39 e 182,69 a 410,51 unidades para cordeiros T0, T250, T500, T750, T1000 e T1250, respectivamente.

O VAMI do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal foram afetados pelo tratamento experimental ($P < 0,001$, Tabela 4), mas não pelos blocos de animais. O VAMI do tecido adiposo subcutâneo caudal foi maior para T1000 e T1250 que para T0 e T250. O VAMI do tecido adiposo perirenal foi maior para T750, T1000 e T1250 que para T0, T250 e T500; ele foi maior para T500 que para T0. O VAMI do tecido adiposo perirenal não diferiu significativamente para T750, T1000 e T1250. A resposta do VAMI aos tratamentos teve uma relação linear com a IMDC ($P < 0,001$ para ambos os locais de medida, Figura 2), sem nenhum efeito quadrático ($P = 0,832$ e $P = 0,350$ para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente). De forma similar, a resposta do VAMI aos tratamentos teve uma relação linear com a IMDL ($P < 0,001$ para ambos os locais de medida, Figura 3), sem nenhum efeito quadrático ($P = 0,832$ e $P = 0,350$ para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente). A equação de regressão variou com o local de medida, com intercepto comum, mas foi observada maior inclinação para o tecido adiposo perirenal que para subcutâneo caudal ($P < 0,05$), a equação de regressão para os dados médios dos oito animais sendo:

$$\text{VAMI} = 172,23 \text{ (e.p. } 9,017) + a \text{ (e.p. } 0,05622) \text{ IMDC} \quad (2)$$

Onde $r^2 = 0,91$, d.p.r. = 17,27, $n = 12$, $a = 0,3783$ e $0,5322$ para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente.

$$\text{VAMI} = 171,93 \text{ (e.p. } 9,045) + b \text{ (e.p. } 0,07891) \text{ IMDL} \quad (3)$$

Onde $r^2 = 0,91$, d.p.r. = 17,27, $n = 12$, $b = 0,5316$ e $0,7470$ para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente.

O VAMI do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal aumentaram linearmente ($P < 0,001$) com a CCPA, sem nenhum efeito quadrático ($P = 0,101$ e $P = 0,250$ para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente) (Figura 4). A equação de regressão do VAMI sobre a CCPA variou com o local de medida, com um intercepto comum, mas foi observada maior inclinação para o tecido adiposo perirenal que para subcutâneo caudal ($P < 0,005$), a equação de regressão para os dados médios dos oito animais sendo:

$$\text{VAMI} = 170,56 \text{ (e.p. 6,899)} + c \text{ (e.p. 0,2072)} \text{ CCPA} \quad (4)$$

Onde $r^2 = 0,95$, d.p.r. = 13,18, $n = 12$, $c = 1,8686$ e 2,6199 para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente.

Todos os cordeiros que receberam até 500 g de alfafa desidratada por dia no experimento 1 apresentaram VAMI para o tecido adiposo perirenal menores que 270 unidades, embora 28 dos 33 cordeiros mantidos em pasto no experimento 2 tiveram valores maiores que 270 unidades.

No experimento 1, não foi observado efeito significativo dos blocos de animais sobre os valores de L^* , a^* , e b^* no tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal. Não foi observado efeito significativo do tratamento experimental sobre L^* , a^* , e b^* do tecido adiposo subcutâneo caudal nem sobre o valor L^* e a^* do tecido adiposo perirenal (Tabela 5). O valor b^* do tecido adiposo perirenal foi afetado pelo tratamento ($P < 0,01$). Ela foi maior para T1000 e T750 que para T500. A resposta do valor b^* do tecido adiposo perirenal ao tratamento teve uma relação linear com a IMDC e IMDL ($P < 0,01$), sem nenhum efeito quadrático ($P = 0,972$ em ambos os casos).

No experimento 2, o VAMI do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal foram 293,16 (e.p. 14,437) e 373,82 (e.p. 19,958) unidades, variando de 129,65 a 470,85 e 195,45 a 629,25, respectivamente. O valor b^* do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal foram 15,80 (e.p. 0,549) e 14,70 (e.p. 0,404), variando de 6,79 a 21,55 e 10,01 a 19,87, respectivamente.

DISCUSSÃO

No experimento 1, o manejo alimentar foi eficiente assegurando: i) ingestão média diária de alfafa desidratada de 95,8% a 99,9% dos níveis designados, e ii) ganho médio diário similar para todos os tratamentos, evitando assim, efeito de diluição sobre a concentração dos carotenóides na gordura (Prache et al., 2003b).

A concentração de carotenóides na alfafa desidratada foi 280,6 $\mu\text{g/g}$ MS. Este valor é de aproximadamente 40% a 65% das concentrações observadas por Prache et al. (2003a) em pastagem verde fresca (432,9 a 696,6 $\mu\text{g/g}$ MS). Este menor nível comparado com pastagem fresca é provavelmente devido ao processo de desidratação (Nozière et al., 2006b). Entretanto, vale a pena ressaltar que o perfil de carotenóides foi diferente entre

alfafa desidratada e pastagem verde fresca, particularmente a luteína que correspondeu a 71% dos pigmentos carotenóides totais na alfafa desidratada contra 54% a 60% na pastagem verde fresca (Prache et al., 2003a). Isso é importante porque a luteína é o único pigmento carotenóide estocado no tecido adiposo de ovinos (Yang et al., 1992; Prache et al., 2003b). A alfafa desidratada foi desta forma, um bom modelo para estudar a curva da dose-resposta relacionando a concentração de luteína no tecido adiposo ao nível de ingestão diário em ovinos. Embora o nível de ingestão de carotenóides fosse provavelmente menor que em cordeiros mantidos em pasto, i) a proporção de luteína foi maior na alfafa desidratada que na pastagem observada por Prache et al., (2003a), e ii) a concentração de luteína na dieta e o nível de ingestão de luteína puderam ser facilmente controlados em cordeiros mantidos em baias individuais. O β -caroteno correspondeu a 14% dos pigmentos carotenóides totais na alfafa desidratada contra 22% a 26% em pastagem verde fresca observada por Prache et al. (2003a). A contribuição da zeaxantina foi quase similar em ambos os tipos de forragens, com valores de 8% na alfafa desidratada e 6% a 9% em pastagem verde fresca. Supondo que os cordeiros em pasto tenham consumido 1 kg MS/dia de forragem no período próximo a data de abate (Delagarde et al., 2001), e que a concentração de luteína da forragem verde seja de aproximadamente 252 mg/kg MS (Prache et al., 2003a); então a ingestão diária de luteína observada neste estudo para cordeiros T1250 foi aproximadamente 16% menor que para cordeiros mantidos em pasto no período próximo à data de abate.

No experimento 1, a CCPA aumentou linearmente com a IMDC, e a equação 1 permite predições. Entretanto, a CCPA foi muito menor nos cordeiros T1250 que em cordeiros mantidos em pasto (59 vs. 112 $\mu\text{g/L}$, $P < 0,001$), presumidamente devido as diferenças no nível de ingestão em carotenóides.

No experimento 1, o VAMI do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal aumentaram com a IMDC e IMDL. As equações 2 e 3 predizem o VAMI a partir da ingestão de carotenóide e luteína, respectivamente. O intercepto da equação de regressão foi similar para ambos locais de medida, mas a inclinação foi maior para o tecido adiposo perirenal que no tecido adiposo subcutâneo caudal. Este resultado está de acordo com os estudos anteriores, relatando que a concentração de carotenóides (Kirton et al., 1975) ou

VAMI (Priolo et al., 2002b) foi maior no tecido adiposo perirenal que no subcutâneo caudal.

O VAMI do tecido adiposo perirenal foi similar entre os cordeiros dos tratamentos T750, T1000 e T1250. Isto levanta a questão se um platô foi alcançado do nível T750 em diante ou se este resultado foi devido à variabilidade entre os cordeiros na absorção de luteína. Não foi observado nenhum efeito quadrático significativo na curva resposta. Além disso, combinando os resultados do experimento 1 e 2, há evidência em confirmar uma relação linear. O VAMI do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal dos cordeiros em pasto no experimento 2 foram 293,16 e 373,82, respectivamente. Usando a equação 3, o correspondente nível de ingestão diário de luteína foi predito entre 230-270 mg, em acordo com o nível de ingestão de forragem em cordeiros em pasto e a concentração de luteína na forragem obtida por Prache et al (2003a). Também, a relação entre VAMI e CCPA permaneceu inteiramente linear quando os dados dos dois experimentos foram unidos, ou seja, quando adicionado os dados de cordeiros alimentados em pasto em que a CCPA foi maior que para cordeiros do experimento 1 (Figure 5). A equação de regressão para a média dos dados torna-se então:

$$\text{VAMI} = 190,34 \text{ (e.p. } 9,977) + d \text{ CCPA} \quad (5)$$

Onde $r^2 = 0,88$, d.p.r. = 23,22, $n = 14$, $d = 1,1192$ (e.p. 0,21440) e 1,8569 (e.p. 0,21294) para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente.

Entretanto, foi observado que o nível de ingestão de carotenóides no experimento 2 foi mais sujeito às variações que no experimento 1, devido as prováveis variações na concentração de carotenóides na pastagem e nível de ingestão de forragem.

Os dados do presente estudo permitem propor equações para prever a concentração média dos pigmentos carotenóides no plasma e o VAMI do tecido adiposo a partir do nível de ingestão médio diário em carotenóides. Este estudo de dose-resposta pode fornecer informações a respeito dos efeitos da disponibilidade de forragem, concentração de carotenóides na forragem e suplementação de concentrado em pasto sobre a concentração de carotenóides no sangue e tecido adiposo em cordeiros em pasto, que são todos os fatores que podem afetar os níveis de ingestão de carotenóides no animal. Futuros trabalhos serão necessários para estudar a interação da curva da dose-resposta com fatores que podem afetar a resposta animal, como padrão de crescimento e raça.

Em estudos anteriores, foi observado que o tecido adiposo foi levemente mais amarelo em cordeiros mantidos em pasto que em confinados (Priolo et al 2002a), devido aos pigmentos carotenóides. Neste estudo, o valor b^* do tecido adiposo perirenal aumentou linearmente com a IMDC e IMDL, apesar da grande variabilidade individual.

A partir dos dados do presente estudo, foi observado claramente o nível de variabilidade individual na absorção de carotenóides e estocagem. Embora o nível de ingestão de carotenóides fosse similar para todos os cordeiros dentro dos níveis de tratamento no experimento 1, algumas variabilidades individuais na concentração de carotenóides no plasma e tecido adiposo foram observadas. Nos cordeiros T1250, por exemplo, a concentração de carotenóides no plasma variou de 28 a 95 $\mu\text{g/L}$, e o VAMI para tecido adiposo perirenal variou de 182,69 a 410,51 unidades.

Prache e Theriez (1999) foram os primeiros a descobrir que carotenóides no sangue e tecido adiposo poderiam ser utilizados como traçadores de alimentos a base de forragem em ovinos e este resultado foi confirmado em posteriores experimentos, comparando-se ovinos e bovinos alimentados em pasto ou concentrado (Prache et al., 2002; Priolo et al., 2002b; Prache et al., 2003ab; Serrano et al., 2006). Entretanto, era incerto em que extensão a inclusão de alfafa desidratada (e outras plantas verdes) nos concentrados poderiam afetar a confiança de discriminação entre cordeiros alimentados em pasto ou concentrado. A alfafa desidratada é estritamente forragem, mas a alimentação a base de alfafa para animais confinados não tem a mesma conotação “natural” no senso popular como a alimentação em pasto, e este estudo ajuda a responder esta questão. O uso combinado de todos os dados individuais de plasma e tecido adiposo perirenal dos experimentos 1 e 2 (Figura 6), permitiu discriminar todos os cordeiros mantidos em pasto daqueles recebendo até 500 g de alfafa desidratada por dia. Todos os 24 cordeiros recebendo até 500 g de alfafa desidratada por dia apresentaram valores para CCPA e VAMI do tecido adiposo perirenal menores que 40 $\mu\text{g/L}$ e 270 unidades respectivamente, valores estes nunca observados nos 33 cordeiros mantidos em pasto no experimento 2. Cordeiros apresentando valores para CCPA maior que 95 $\mu\text{g/L}$ ou VAMI do tecido adiposo perirenal maior que 411 unidades foram todos encontrados em cordeiros em pasto (15 dos 33 cordeiros mantidos em pasto). Entretanto, foram observadas algumas sobreposições na distribuição de cordeiros mantidos em pasto e cordeiros alimentados com mais de 500 g de alfafa desidratada por dia.

A inclusão de altos níveis de alfafa desidratada no concentrado pode, desta forma, afetar o potencial do método de autenticação de alimentação a base de forragem, baseado nos carotenóides no plasma e tecido adiposo. Entretanto, a inclusão de altos níveis de alfafa desidratada no concentrado pode afetar os atributos sensoriais da carne em ovinos. Young et al. (2003) observaram que incorporando 780 g/kg de alfafa seca em uma dieta concentrada, notou-se um aumento dos níveis de ácidos graxos de cadeia ramificada no tecido adiposo de ovinos, comparado a ovinos mantidos em pasto, afetando, assim, o sabor da carne. Finalmente, outros compostos moleculares e atômicos poderiam ser combinados com os pigmentos carotenóides para promover uma melhora na autenticação da dieta (Prache et al., 2005). Futuras pesquisas com cordeiros mantidos em pasto, cordeiros com dieta a base de grãos, e cordeiros com dieta a base de alfafa desidratada serão necessárias para comparar os atributos sensoriais da carne e combinar alguns compostos para autenticação da dieta.

CONCLUSÕES

As concentrações dos pigmentos carotenóides no sangue e tecido adiposo aumentaram linearmente com a ingestão média diária de carotenóides. Este estudo confirma que a fixação de carotenóides é menor no tecido adiposo subcutâneo caudal que no tecido adiposo perirenal. Embora o nível de ingestão de carotenóides fosse similar para todos os cordeiros dentro dos níveis de tratamento, alguma variabilidade individual na concentração de carotenóides no plasma e tecido adiposo foi sempre observada. Agrupando os resultados de carotenóides no plasma e tecido adiposo perirenal, foi possível discriminar cordeiros em pasto daqueles cordeiros recebendo até 500 g de alfafa desidratada por dia em confinamento. Entretanto, a inclusão de altos níveis de alfafa desidratada na dieta de ovinos confinados pode afetar a confiabilidade do método baseado nos carotenóides no plasma e tecido adiposo. Neste caso, futuras pesquisas combinando outros compostos moleculares e atômicos aos pigmentos carotenóides devem ser realizadas.

LITERATURA CITADA

Cardinault, N., M. Doreau, C. Poncet, and P. Nozière. 2006. Digestion and absorption of carotenoids in sheep fed fresh red clover. *Anim. Sci.* 82: 49-55.

- CIE. 1986. Colorimetry. 2nd ed. CIE Publ. No 15.2. Commission International de l'Eclairage, Vienna.
- Delagarde, R., S. Prache, M. Petit, and P. D'Hour. 2001. Ingestion de l'herbe par les ruminants au pâturage. *Fourrages*, 189-212.
- European Council Directive n° 609 (1986).
- Fisher, A. V., and H. de Boer. 1994. The EAAP standard method of sheep carcass assessment. Carcass measurements and dissection procedures. Report of the EAAP Working Group on Carcass Evaluation, in cooperation with the CIHEAM Instituto Agronomico Mediterraneo of Zaragoza and the CEC Directorate General for Agriculture in Brussels. *Livest. Prod. Sci.* 38:149-156.
- Karijord, O. 1978. Correlation between the content of carotenoids in depot fat and in plasma of sheep. *Acta Agric. Scand.* 28:355-359.
- Kirton, A. H., B. Crane, D. J. Paterson, and N. T. Clare. 1975. Yellow fat in lambs caused by carotenoids pigmentation. *N. Z. J. Agric. Res.* 18:267-272.
- Lyan, B., V. Azais-Braesco, N. Cardinault, V. Tyssandier, P. Borel, M. C. Alexandre-Gouabau, and P. Grolier. 2001. Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.* 751:297-303.
- Martin, B., A. Cornu, N. Kondjoyan, A. Ferlay, I. Verdier-Metz, P. Pradel, E. Rock, Y. Chilliard, J. B. Coulon, and J. L. Berdagué. 2005. Milk indicators for recognizing the types of forages eaten by dairy cows. In: Hocquette, J. F., Gigli, S. (Eds), *Indicators of milk and beef quality*. Proc. European Association of Animal Production Publication, No. 112, Bled, Slovenia, 127-136.
- Nozière P., P. Grolier, D. Durand, A. Ferlay, P. Pradel, and B. Martin. 2006a. Variation of carotenoids, fat-soluble micronutrients and color in cow's plasma and milk following changes in forage and feeding level. *J. Dairy Sci.* 89:2634-2648.
- Nozière, P., B. Graulet, A. Lucas, B. Martin, P. Grolier, and M. Doreau. 2006b. Carotenoids in ruminants: from forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, in press.
- Patterson, D. S. P. 1965. The association between depot fat mobilization and the presence of xanthophyll in the plasma of normal sheep. *J. Agric. Sci.* 64:273-278.

- Prache, S., and M. Theriez. 1999. Traceability of lamb production systems: carotenoids in plasma and adipose tissue. *Anim. Sci.* 69:29-36.
- Prache, S., A. Priolo, H. Tournadre, R. Jailler, H. Dubroeuq, D. Micol, and B. Martin. 2002. Traceability of grass feeding by quantifying the signature of carotenoid pigments in herbivores meat, milk and cheese. Pages 592-593 in Proc. 19th Gen. Meet. Eur. Grassl. Fed. La Rochelle, France.
- Prache, S., A. Priolo, and P. Grolier. 2003a. Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: its significance for the traceability of grass-feeding. *J. Anim. Sci.* 81:360-367.
- Prache, S., A. Priolo, and P. Grolier. 2003b. Effect of concentrate finishing on the carotenoid content of perirenal fat in grazing sheep: its significance for discriminating grass-fed, concentrate-fed and concentrate-finished grazing lambs. *Anim. Sci.* 77:225-233.
- Prache, S., A. Cornu, J. L. Berdagué and A. Priolo. 2005. Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research.* 59:157-168.
- Priolo, A., D. Micol, J. Agabriel, S. Prache, and E. Dransfield. 2002a. Effect of grass or concentrate feeding systems on lamb carcass and meat quality. *Meat Sci.*, 62:179-185.
- Priolo, A., S. Prache, D. Micol, and J. Agabriel. 2002b. Reflectance spectrum to trace grass feeding in sheep: Influence of measurement site and shrinkage time after slaughter. *J. Anim. Sci.* 80:886-891.
- Russel A. J. F., J. M. Doney, and R. G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci., Camb.* 72:451-454.
- SAS (1999). *SAS/STAT User's Guide*, Version 8. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Serrano E., S. Prache, B. Chauveau, P. Pradel, J. Agabriel, and D. Micol. 2006. Traceability of grass-feeding in young beef using carotenoid pigments in plasma and adipose tissue. *Anim. Sci.*, in press.
- Yang, A., T. W. Larsen, and R. K. Tume. 1992. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 43:1809-1817.
- Young, O. A., G. A. Lane, A. Priolo, and K. Fraser. 2003. Pastoral and species flavour in lambs raised on pasture, lucerne or maize. *J. Sci. Food Agric.*, 83:93-104.

Tabela 1. Composição do concentrado fornecido aos cordeiros no experimento 1 (g/kg com base na matéria seca)

Componentes	
Cevada	200,0
Trigo	120,0
Trigo vermelho curto	50,0
Casca de semente de vagem	50,0
Farelo de trigo	150,0
Farelo de soja	88,0
Resíduo de malte	21,0
Polpa seca de açúcar de beterraba	150,0
Casca de beterraba	44,0
Melaço de açúcar de beterraba	40,0
Formalina	3,5
Carbonato de cálcio, cloreto de sódio, cloreto de amônio, minerais ¹ e vitaminas ²	83,5

¹14 g/kg de Ca, 4,5 g/kg de P, 150 mg/kg de Zn, 108 mg/kg de Fe, 50 mg/kg de Mn, 2 mg/kg de Co, 6,5 mg/kg de I, 0,182 mg/kg de Se.

²6000 UI/kg de vitamina A, 1200 UI/kg de vitamina D3, 20 UI/kg de vitamina E.

Tabela 2. Características dos cordeiros no experimento 1

	Nível de alfafa desidratada oferecida (g/d)						SEM	<i>P</i>
	0	250	500	750	1000	1250		
Ganho médio diário ¹ , g/d	246	235	231	242	247	254	20,5	0,254
Idade de abate, d	130	130	129	130	132	131	1,8	0,083
Peso de abate, kg	38,4ab	37,6b	37,8b	38,4ab	39,2a	39,3a	0,99	0,005
Peso de carcaça, kg	16,21	15,59	15,53	15,49	15,38	15,30	0,998	0,527
Espessura do tecido adiposo subcutâneo caudal, mm	3,5a	2,6ab	2,6ab	2,7ab	2,1b	2,6ab	0,72	0,021
Peso do tecido adiposo perirenal, kg	0,137	0,087	0,116	0,105	0,092	0,102	0,0345	0,076

¹do nascimento ao abate

Tabela 3. Concentração de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ matéria seca) dos alimentos fornecidos no experimento 1

	Luteína	Beta-caroteno	Zeaxantina	Epiluteína	Carotenóides totais
Alfafa desidratada	200,2	38,8	23,0	18,6	280,6
Concentrado	2,1	0,0	0,1	0,2	2,4
Palha de aveia	2,0	0,0	0,0	0,0	2,0

Tabela 4. Nível de ingestão médio diário de alfafa desidratada, concentrado, palha de aveia, carotenóides e luteína, concentração média de carotenóides no plasma ao abate e VAMI¹ do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal no experimento 1

	Nível oferecido de alfafa desidratada (g/dia)						SEM	P
	0	250	500	750	1000	1250		
Ingestão média diária de alfafa, g/d	0	247	495	749	981	1196	16,2	< 0,001
	f	E	d	c	b	a		
Ingestão média diária de concentrado, g/d	1072	724	434	249	76	25	124,2	< 0,001
	a	B	c	d	e	e		
Ingestão média diária de palha de aveia, g/d	153	157	211	223	201	162	40,72	< 0,001
	b	B	ab	a	ab	b		
Ingestão média diária de carotenóides, mg/d	2,40	63,07	123,93	186,51	243,55	296,80	4,010	< 0,001
	f	e	d	c	b	a		
Ingestão média diária de luteína, mg/d	2,21	45,36	88,70	133,28	173,89	211,84	2,864	< 0,001
	f	e	d	c	b	a		
log (concentração de carotenóides no plasma ao abate, µg/L)	1,107	2,156	3,124	3,657	3,943	4,017	0,7588	< 0,001
	c	b	a	a	a	a		
log (VAMI ¹ do tecido adiposo subcutâneo caudal, unidades)	5,1600	5,2072	5,3720	5,4277	5,6623	5,5723	0,2364	< 0,001
	b	b	ab	ab	a	a		
log (VAMI ¹ do tecido adiposo perirenal, unidades)	5,1163	5,2498	5,4049	5,6838	5,7478	5,7150	0,2273	< 0,001
	c	bc	b	a	a	a		

Valores com letras diferentes dentro da mesma linha são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

¹VAMI: valor absoluto médio da integral do espectro transcrito entre 450 e 510 nm

Tabela 5. Valores médios de luminosidade (L^*), intensidade de cor vermelha (a^*), e intensidade de cor amarela (b^*) do tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal após 24h refrigeração no experimento 1

	Nível oferecido de alfafa desidratada (g/d)						SEM	<i>P</i>
	0	250	500	750	1000	1250		
Tecido adiposo subcutâneo caudal								
L^*	68,24	68,27	71,06	68,45	73,04	70,38	3,712	0,073
a^*	2,398	2,927	1,488	2,340	1,812	1,473	1,634	0,427
b^*	14,66	15,57	14,07	15,18	15,46	15,25	2,214	0,759
Tecido adiposo perirenal								
L^*	69,13	70,51	72,55	72,83	73,66	74,17	3,680	0,070
a^*	4,775	3,816	2,918	4,756	4,339	3,548	2,339	0,565
b^*	13,47ab	13,63ab	12,66b	15,51a	15,60a	14,84ab	1,750	0,006

Valores com letras diferentes dentro da mesma linha são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

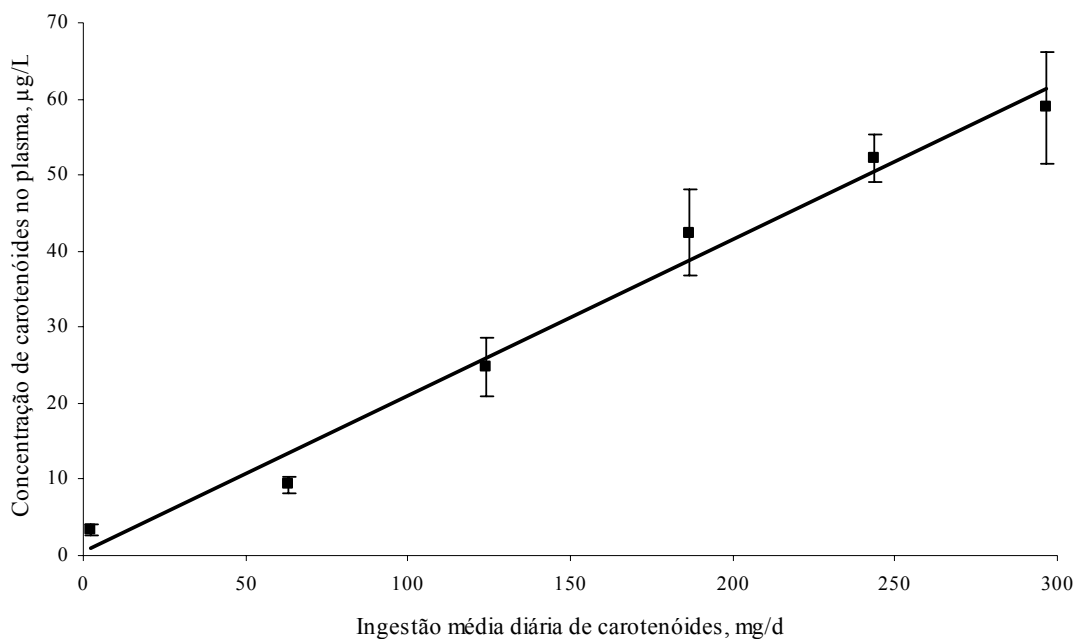


Figura 1. Curva da dose-resposta relacionando a concentração de carotenóides no plasma ao abate (CCPA) ao nível de ingestão médio diário de carotenóides (IMDC) no experimento 1. Barras representam o erro padrão.

A equação de regressão para é: $CCPA = 0,38$ (e.p. 0,02501) + $(0,2052$ (e.p. 0,01364)) x IMDC), Onde $r^2 = 0,98$, $P < 0,001$, d.p.r. = 3,387, $n = 6$

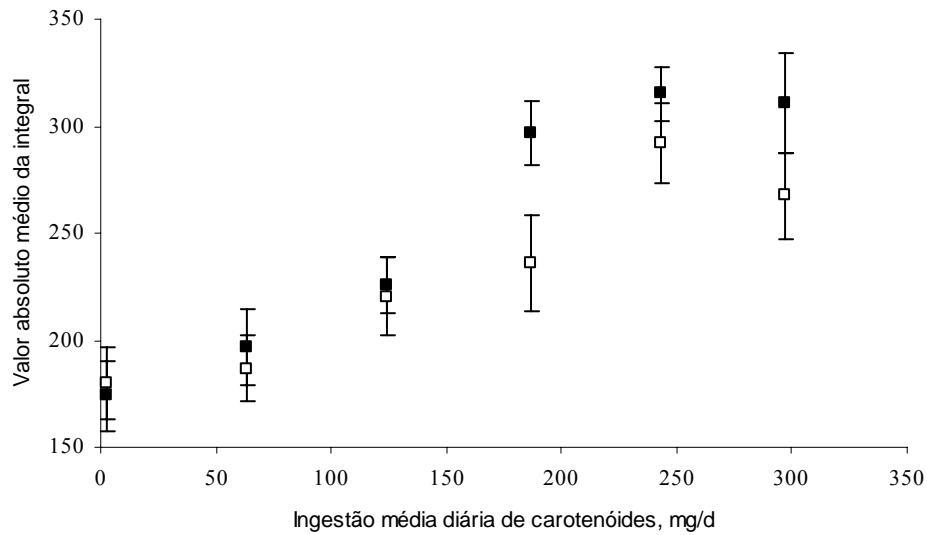


Figura 2. Curva da dose-resposta relacionando o valor absoluto médio da integral entre 450 e 510 nm (VAMI) para o tecido adiposo perirenal (■) e subcutâneo caudal (□) ao nível de ingestão médio diário de carotenóides (IMDC) no experimento 1. Barras representam o erro padrão.

A equação de regressão é: $VAMI = 172,23$ (e.p. 9,017) + a (e.p. 0,05622) IMDC, Onde $r^2 = 0,91$, $P < 0,001$, d.p.r. = 17,27, $n = 12$, $a = 0,3783$ e 0,5322 para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente.

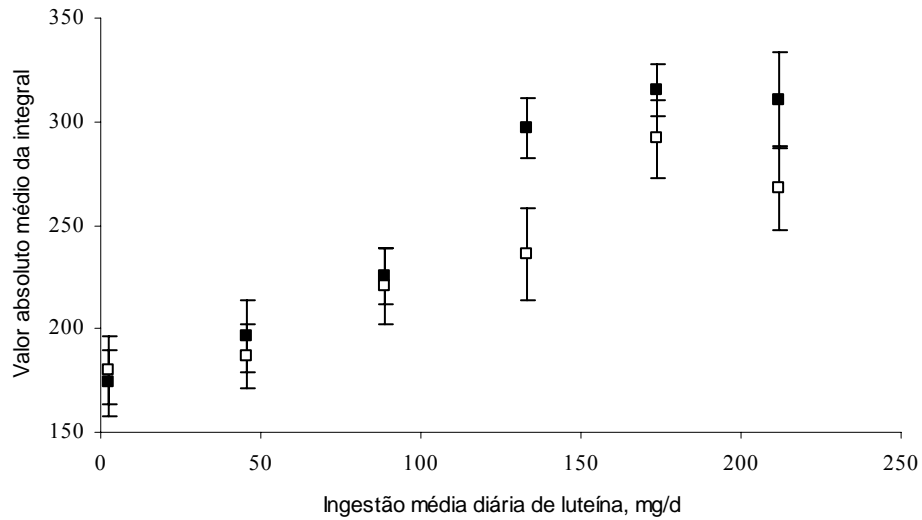


Figura 3. Curva da dose-resposta relacionando o valor absoluto médio da integral entre 450 e 510 nm (VAMI) para o tecido adiposo perirenal (■) e subcutâneo caudal (□) ao nível de ingestão médio diário de luteína (IMDL) no experimento 1. Barras representam o erro padrão.

A equação de regressão é: $VAMI = 171,93 \text{ (e.p. } 9,045) + b \text{ (e.p. } 0,07891) \text{ IMDL}$, Onde $r^2 = 0,91$, $P < 0,001$, d.p.r. = 17,27, $n = 12$, $b = 0,5316$ e $0,7470$ para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente.

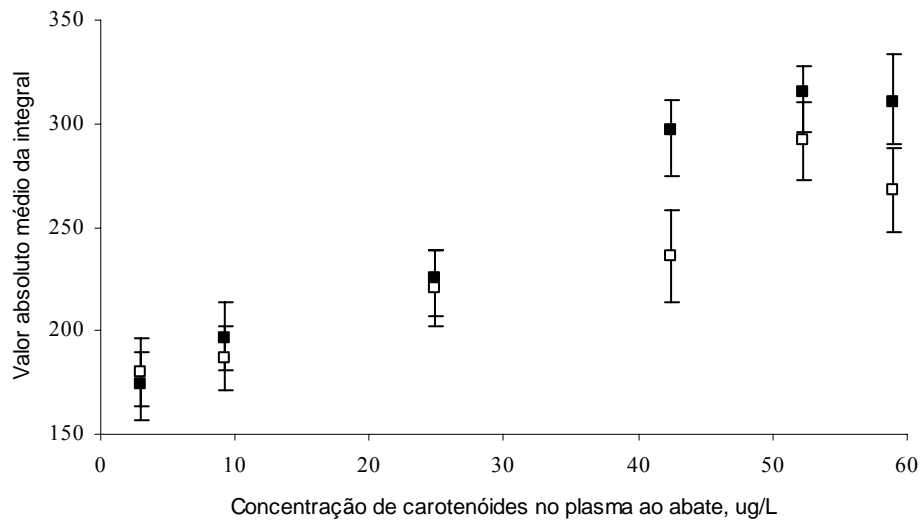


Figura 4. Curva da dose-resposta relacionando o valor absoluto médio da integral entre 450 e 510 nm (VAMI) para o tecido adiposo perirenal (■) e subcutâneo caudal (□) a concentração média de carotenóides no plasma ao abate (CCPA). Barras representam o erro padrão.

A equação de regressão é: $VAMI = 170,56 \text{ (e.p. 6,899)} + c \text{ (e.p. 0,2072)} CCPA$, Onde $r^2 = 0,95$, $P < 0,001$, $d.p.r. = 13,18$, $n = 12$, $c = 1,8686$ e $2,6199$ para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente.

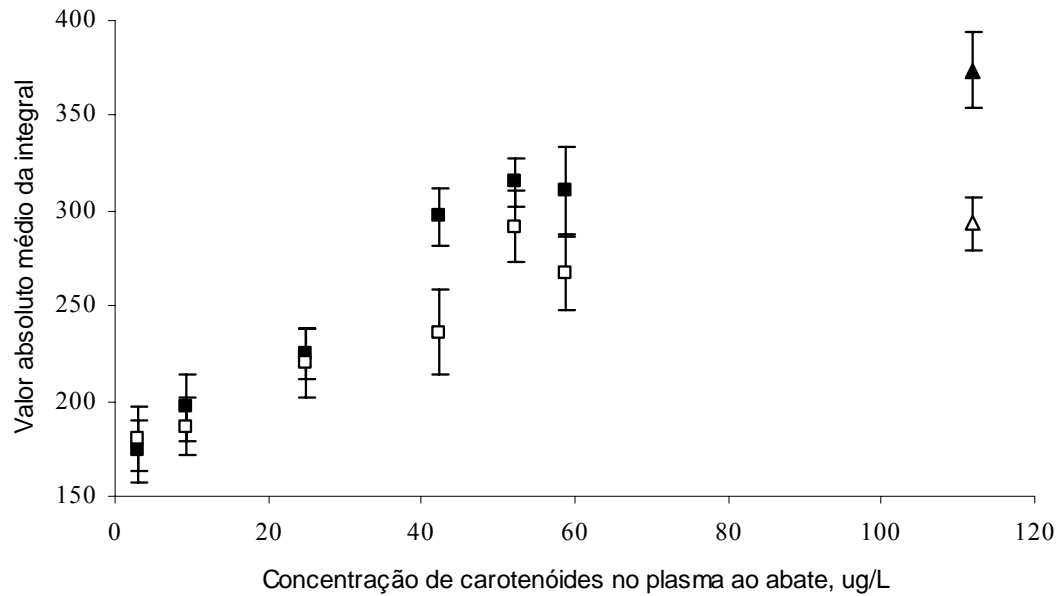


Figura 5. Curva da dose-resposta relacionando o valor absoluto médio da integral entre 450 e 510 nm (VAMI) para o tecido adiposo perirenal (símbolos sólidos) e subcutâneo caudal (símbolos abertos) a concentração média de carotenóides no plasma ao abate. Quadrados e triângulos referem-se ao experimento 1 e 2, respectivamente. Barras representam o erro padrão.

A equação de regressão é: $VAMI = 190,34 \text{ (e.p. } 9,977) + d \text{ CCPA}$, Onde $r^2 = 0,88$, $P < 0,001$, d.p.r. = 23,22, $n = 14$, $d = 1,1192 \text{ (e.p. } 0,21440) \text{ e } 1,8569 \text{ (e.p. } 0,21294)$ para o tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal, respectivamente.

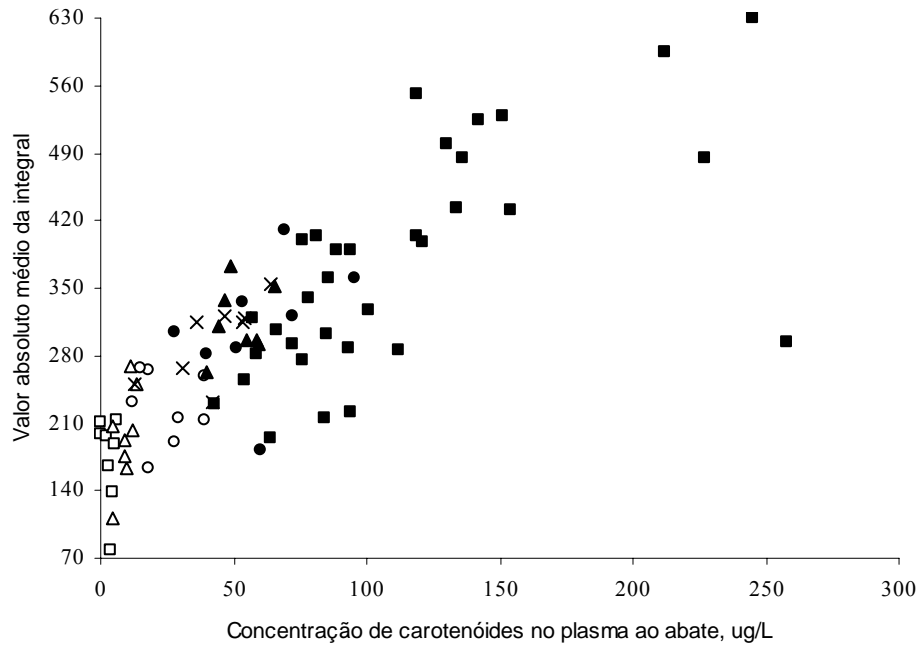


Figura 6. Distribuição dos cordeiros de acordo com a concentração de carotenóides no plasma ao abate e valor absoluto médio da integral entre 450 e 510 nm (VAMI) para o tecido adiposo perirenal, no experimento 1: T0 (□), T250 (Δ), T500 (○), T750 (x), T1000 (▲) e T1250 (●) e no experimento 2 (■, cordeiros alimentados em pasto).

Validação e desenvolvimento da espectroscopia de reflectância visível e dos pigmentos carotenóides para autenticação da dieta em cordeiros

Resumo

A concentração dos pigmentos carotenóides no plasma e espectroscopia de reflectância visível entre 400-700 nm e 450-510 nm (zona de absorção de luz pelos pigmentos carotenóides) foi utilizada para autenticar cordeiros alimentados em pasto (P) e confinados (C). Foram utilizados 307 cordeiros da raça Limousine (143 P e 164 C) durante dois anos. A duração do período de pastagem para os cordeiros P variou de 94 a 187 dias. A concentração de carotenóides no plasma foi medida ao abate. O espectro de reflectância foi medido ao abate e após 24h de refrigeração no tecido adiposo subcutâneo caudal e perirenal. O método de concentração de carotenóides no plasma classificou corretamente 97,01% dos cordeiros. A proporção de cordeiros corretamente classificados usando os dados de reflectância do tecido adiposo entre 400-700 nm foi maior que a 450-510 nm ($P < 0,0001$). Com medidas realizadas sobre o tecido adiposo perirenal após 24h de refrigeração, a proporção de cordeiros corretamente classificados foi de 88,51% e 93,89% para cada método, respectivamente.

Palavras-chave: alimentação em pasto, autenticação, carcaça; carotenóides; cordeiros; reflectância; tecido adiposo

Validation and developments in the use of visible reflectance spectroscopy and carotenoid pigments for diet authentication in lambs

Abstract

Plasma carotenoid concentration and visible reflectance spectroscopy in a range of 400-700 nm or 450-510 nm (i.e., the zone of light absorption by carotenoid pigments) were used to discriminate pasture- (P) v. stall-fed (S) lambs. A total of 307 (143 P and 164 S) Limousine lambs were used over 2 years. The grazing period for P lambs ranged from 94 to 187 days. Plasma carotenoid concentration was measured at slaughter. Reflectance spectrum of perirenal and subcutaneous caudal fat was measured at slaughter and after 24h of shrinkage. Plasma carotenoid concentration enabled a correct classification of 97.01% of lambs. The discrimination reliability was higher using a fat reflectance data between 400 and 700 nm than between 450 and 510 nm ($P < 0.0001$). With measurements made on perirenal fat after 24h of shrinkage, the correctly classified lambs' proportion was 88.51% and 93.89% for each method, respectively.

Keywords: authentication; carcass; carotenoid; fat; pasture-feeding; reflectance; sheep

1. Introdução

Recentes estudos (Enser, Hallett, Hewett, Fursey, Wood & Harrington, 1998; Nürnberg, Grumbach, Zupp, Hartung, Nürnberg & Ender, 2001; Aurousseau, Bauchart, Calichon, Micol & Priolo, 2004) demonstraram que a carne de ruminantes alimentados com forragem tem uma composição em ácidos graxos que pode ser mais benéfica para a saúde humana, comparada com animais com dieta à base de concentrado. Além disso, há uma demanda de consumidores interessados em informações a respeito do alimento fornecido aos animais e um aumento de consumidores interessados na “imagem verde” dos produtos de origem animal (Prache & Theriez, 1999). Desta forma, é importante discriminar produtos obtidos em diferentes sistemas de produção, em particular, em pasto vs. em confinamento.

Esforços vêm recentemente sendo feitos para desenvolver ferramentas para quantificar componentes específicos no produto ou tecido animal que possam atuar como traçadores do tipo de alimentação consumida pelos animais (Prache, Cornu, Berdagué & Priolo, 2005; Martin et al., 2005).

Pigmentos carotenóides vêm mostrando serem bons biomarcadores em ovinos alimentados em pasto (Prache & Theriez, 1999; Prache et al., 2002; Priolo, Prache, Micol & Agabriel, 2002). Concentração de carotenóides no plasma foi utilizada com sucesso para discriminar cordeiros alimentados em pasto e confinados (Prache, Priolo & Grolier, 2003). Também, Prache & Theriez (1999) propuseram uma análise matemática do espectro de reflectância do tecido adiposo entre 450-510 nm (zona de absorção de luz pelos carotenóides) para quantificar a presença destes pigmentos. Este método é também de interesse prático, visto que ele não é invasivo, rápido e fácil de ser implementado na indústria da carne com auxílio de um espectrofotômetro portátil. Todavia, estes estudos foram realizados com um pequeno número de animais demonstrando uma alta variabilidade na resposta animal. Assim, uma validação sobre um grande número de animais é essencial.

O propósito deste estudo foi: i) validar sobre um grande número de animais o uso dos métodos de concentração de carotenóides no plasma e análise matemática do espectro de reflectância do tecido adiposo entre 450-510 nm para discriminar cordeiros alimentados em pasto e confinado; ii) explorar todo o potencial do espectro de reflectância do tecido adiposo, usando os dados de reflectância na região entre 400-700 nm.

2. Material e Métodos

Este estudo foi executado durante 2 anos (2004-2005) na fazenda experimental da Unidade de Mont Dore no município de Orcival, pertencente ao INRA, Centro de Clermont – Ferrand – Theix, França. Os animais foram manejados por pessoas especializadas que buscavam o bem-estar animal de acordo com a Diretriz da União Européia No. 609/1986.

2.1. Modelo experimental.

Dois tratamentos alimentares foram comparados: alimentação a base de forragem (em pasto) vs. alimentação a base de concentrado (confinamento). Cordeiros mantidos em pasto (P), pastejaram forragem verde, sem suplementação, a partir de Maio até o abate que ocorreu entre Agosto e Setembro, em 2004 e 2005. Cordeiros confinados (C) foram alimentados *ad libitum* com concentrado e feno de pastagem natural da montanha. Os animais foram abatidos quando atingiram um nível satisfatório de gordura que foi manualmente avaliado por técnicos experientes de acordo com o método de Russel, Doney & Gunn (1969).

2.2. Animais e dietas

Ao total 307 cordeiros da raça Limousine foram utilizados; 143 cordeiros foram alimentados em pasto (81 machos e 62 fêmeas) e 164 foram confinados (86 machos e 78 fêmeas). Cento e trinta e quatro destes animais foram abatidos em 2004 (91 P e 43 C) e 173 foram abatidos em 2005 (52 P e 121 C).

Os cordeiros P nasceram em Abril (04 a 24 Abril 2004, 06 a 24 Abril 2005, exceto um cordeiro que nasceu no dia 17 de Maio de 2005). Os animais P foram mantidos numa pastagem natural, *ad libitum* a partir de 03 Maio em 2004 e 12 Maio em 2005, até o abate, que ocorreu entre 4 Agosto e 4 Novembro em 2004 e entre 17 Agosto e 3 Novembro em 2005. A pastagem foi sempre manejada para oferecer uma forragem de alta qualidade. A composição botânica da pastagem, estimada visualmente empregando o método de Daget & Poissonet (1971), está apresentada na Tabela 1. Os cordeiros pesavam 9,2 Kg (e.p. 2,21) quando iniciaram o pastejo e uma média de 22 d (e.p. 6,5). Os cordeiros C abatidos em 2004 nasceram entre 12 Novembro 2003 e 12 Abril 2004 e os cordeiros C abatidos em 2005 nasceram entre 17 Novembro 2004 e 11 Abril 2005. Eles foram alimentados com concentrado comercial e feno de pastagem natural da montanha. A composição do concentrado oferecido encontra-se na Tabela 2. Amostras do feno e concentrado oferecidos aos animais foram coletadas duas vezes por semana

para estimações da concentração de carotenóides. Água e blocos de sal estavam sempre disponíveis.

2.3. Procedimentos de abate

Os animais foram transportados ao abatedouro por caminhão. Imediatamente após a chegada, os animais foram abatidos por corte da carótida e da jugular. Após o abate, as carcaças foram colocadas em sala refrigerada a 4°C durante 24h. As carcaças foram sempre mantidas no escuro, devido a sensibilidade dos carotenóides a luminosidade.

2.4. Medidas

2.4.1. Concentração de carotenóides nos alimentos

Carotenóides do concentrado e feno foram extraídos usando o procedimento descrito por Cardinault, Poncet, & Nozière (2006). Componentes lipofílicos de 50 mg dos alimentos triturados e liofilizados foram primeiro extraídos com acetona e então purificados com dietil éter, contendo echinenona como padrão interno. Após saponificação e lavagem com água, os carotenóides foram analisados por CLAE usando o método descrito por Lyan et al. (2001). O cromatógrafo líquido utilizado foi um Waters Alliance 2996 System com detector de fotodiodo monitorado entre 280 e 600 nm. Carotenóides foram separados em uma coluna Nucleosil 150 x 4,6 mm, RP C18,3 µm acoplada com uma coluna Vydac TP 54 250 x 4,6 mm, RP C18,5 µm (Interchin, Montluçon, France). O software Millenium 32 a partir do Waters SA (Saint Quentin em Yvelines, France) foi utilizado como instrumento controle, para aquisição e processamento dos dados. A detecção do comprimento de onda para os carotenóides foi a 450 nm, e os compostos foram identificados comparando tempos de retenção e análises espectrais com aquele do padrão puro (> 95%). As concentrações de cada compostos foram calculadas utilizando curvas de padrão externo e foram ajustadas por porcentagem de recuperação do padrão interno adicionado.

2.4.2. Estimção bruta dos carotenóides totais no plasma

Amostras de sangue, para estimção da concentração de carotenóides no plasma, foram coletadas para todos os cordeiros um dia antes ao abate. Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular de manhã. Plasma foi estocado a -20°C até o dia da análise. Extração de carotenóides do plasma foi realizada dentro de 3 meses após amostragem. Estimção bruta dos carotenóides totais foi determinada por um espectrofotômetro usando o seguinte método: A partir de 3,0 mL de plasma foi adicionado 2,0 mL de água destilada e a proteína foi precipitada com 4,0 mL de etanol. Os carotenóides foram então extraídos com 4,0 mL de hexano. Absorção da camada

superior obtida após centrifugação a 5000 rpm por 5 min foi medida entre 600 e 400 nm usando um espectrofotômetro Kontron Uvikon 860 (Kontron Instruments S.A., Montigny-le-Bretonneux, France). A concentração de carotenóides totais foi calculada por absorção máxima (Karijord, 1978), assumindo o valor de 2.500 para o coeficiente de extinção E1% (Patterson, 1965; Karijord, 1978) e levando em consideração a diluição da amostra original. Cuidados foram tomados durante todo o procedimento experimental e analítico para proteger as amostras da luz natural (tubos de sangue foram identificados e envolvidos por papel alumínio para evitar contato com a luz).

2.4.3. Características dos animais ao abate

Os cordeiros foram pesados antes do abate. Peso da carcaça, peso do tecido adiposo perirenal e espessura do tecido adiposo subcutâneo caudal foram determinados após 24h de refrigeração. O tecido adiposo perirenal e rins foram removidos juntos da carcaça e, então, separados usando lâmina cortante para pesagem do tecido adiposo separadamente. A pesagem da carcaça fria foi realizada antes da remoção destes itens. A espessura do tecido adiposo subcutâneo caudal foi medida fazendo duas incisões, em que o primeiro corte teve extensão de 4 cm no sentido ventro-lateralmente da linha médio dorsal na altura da última costela e, no limite do corte, estendeu-se outro corte de 4 cm no sentido cranial, sendo que a aba de gordura foi elevada na intercessão das incisões e a gordura subcutânea medida com paquímetro, com cuidado de não produzir deformação (Fisher & de Boer, 1994).

2.4.4. Espectro de reflectância do tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal

O espectro de reflectância do tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal foram medidos em 2004 e 2005 para todos os cordeiros, a comprimentos de onda entre 400 e 700 nm, usando um espectrofotômetro MINOLTA CM-2002 (iluminante D₆₅, angulo observado 10°) para todos os cordeiros. Este instrumento mede a proporção de luz refletida a cada 10 nm. Três replicatas de medidas foram feitas ao abate e após 24h de refrigeração. Para medidas realizadas no tecido adiposo perirenal após 24h de refrigeração, uma superfície plana foi obtida com lâmina cortante para permitir perfeita aderência do tecido adiposo ao leitor do aparelho.

Para quantificar a absorção de luz pelos pigmentos carotenóides no tecido adiposo, o espectro de reflectância foi transcrito e foi admitido o valor de reflectância de 510 nm como zero (VR). Sobre o espectro transcrito, o valor da integral entre 450-510 nm (I₄₅₀₋₅₁₀) foi calculado como segue:

$$I_{450-510}, VR.nm = [(VR_{450} / 2) + VR_{460} + VR_{470} + VR_{480} + VR_{490} + VR_{500} + (VR_{510} / 2)] \times 10$$

O valor da integral foi a média das 3 medidas. O primeiro método de discriminação (método 1) utilizou o valor da integral entre 450-510 nm para discriminar cordeiros P e C.

O espectro de reflectância do tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal também foram explorados utilizando todos os dados na região entre 400-700 nm. Este foi o segundo método utilizado no tecido adiposo (método 2), para discriminar cordeiros P e C. Os dados de reflectância a comprimentos de onda entre 400 e 700 nm foi a média das 3 replicatas. A média dos dados de reflectância (R) foram transformados em log (1/R), e então foram exportados para o Win ISI II v 1.5 software (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) para análise multivariada. O espectro de reflectância médio de cada tecido representando os dois tratamentos alimentares foram submetidos a análises discriminantes usando o método PLS-DA. Antes disto, análises de componente principal foi executada e o espectro de cada regime foi ordenado de acordo com a distância de Mahalanobis (H) ao espectro de reflectância médio, com a finalidade de detectar amostras anômalas “outliers” ($H > 3$). Não foram encontradas amostras anômalas. Os modelos foram testados por validação cruzada.

2.5. Análises estatísticas

A variância da concentração de carotenóides no plasma e $I_{450-510}$ foram estabilizadas usando transformação logarítmica. Os dados foram submetidos a análises de variância usando o procedimento GLM do SAS (SAS, 1999) para examinar o efeito dos tratamentos alimentares.

A proporção de cordeiros corretamente classificados foi analisada utilizando o procedimento do pacote estatístico Proc Catmod do SAS (SAS, 1999) utilizando um modelo tetra-fatorial (tratamento alimentar, método de discriminação, local de medida e tempo de medida), com medidas repetidas sobre os três últimos fatores. O animal foi considerado como unidade experimental.

3. Resultados

As características dos cordeiros P e C estão apresentadas na Tabela 3 e 4, respectivamente. A duração do período de pastagem para os cordeiros P foi em média de 143 dias (e.p. 28,3), variando de 94 a 187 dias. Os cordeiros P foram abatidos a partir de 04 Agosto a 04 Novembro de 2004 e a partir de 17 Agosto a 03 Novembro de 2005.

A concentração de carotenóides no concentrado e feno fornecidos aos cordeiros C foi de 4,3 e 43,6 $\mu\text{g/g MS}$, respectivamente (Tabela 5).

3.1. Concentração de carotenóides no plasma

A concentração de carotenóides no plasma ao abate (CCPA) foi maior para cordeiros P que para cordeiros C ($P < 0,001$). A CCPA para cordeiros P foi em média de 75 $\mu\text{g/L}$ (e.p 2,8), variando de 27 a 194 $\mu\text{g/L}$, embora a CCPA para cordeiros C foi em média 10 $\mu\text{g/L}$ (e.p. 0,8), variando de 0 a 43 $\mu\text{g/L}$. A distribuição dos cordeiros P e C de acordo com a CCPA está ilustrado na Figura 1. A proporção de cordeiros P com CCPA maior que 27 $\mu\text{g/L}$ foi 100,00%, embora a proporção de cordeiros C com CCPA menor que este valor foi 94,02%. Este limiar permitiu classificar corretamente 97,01% das amostras de plasma.

3.2. Espectro de reflectância

O espectro de reflectância médio do tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal entre 400 e 700 nm para cordeiros P e C estão apresentados na Figura 2 e 3, para medidas realizadas ao abate e após 24h de refrigeração, respectivamente.

3.2.1. Espectro de reflectância entre 450-510 nm

3.2.1.1. Tecido adiposo perirenal

O valor médio da $I_{450-510}$ do tecido adiposo perirenal ao abate foi diferente entre cordeiros P e C ($P < 0,001$), com média de -112,31 e -28,81 unidades para cordeiros P e C respectivamente, variando de -300,05 a 30,77 para cordeiros P e de -156,85 a 54,27 unidades para cordeiros C. A distribuição de cordeiros P e C em diferentes classes de valores da integral do tecido adiposo perirenal para medidas realizadas ao abate está apresentada na Figura 4 (a). A proporção de cordeiros P com média da $I_{450-510}$ maior que -55 unidades foi 20,28%, embora a proporção de cordeiros C com $I_{450-510}$ menor que -55 unidades foi 19,50%. Este limiar permitiu classificar corretamente 80,11% dos cordeiros quando a medida foi realizada no tecido adiposo perirenal ao abate.

O valor médio da $I_{450-510}$ do tecido adiposo perirenal após 24h de refrigeração foi diferente entre cordeiros P e C ($P < 0,001$), com média de -265,32 e -128,65 unidades para cordeiros P e C, respectivamente, variando de -487,97 a -78,85 unidades para cordeiros P e de -283,27 a -8,37 unidades para cordeiros C. A distribuição de cordeiros P e C em diferentes classes de valores da integral do tecido adiposo perirenal para medidas realizadas após 24h de refrigeração está apresentada na Figura 4 (b). A proporção de cordeiros P com média da $I_{450-510}$ maior que -200 unidades foi 17,48%, embora a proporção de cordeiros C com $I_{450-510}$ menor que -200 unidades foi 5,49%.

Este limiar permitiu classificar corretamente 88,51% dos cordeiros quando a medida foi realizada no tecido adiposo perirenal após 24h de refrigeração.

3.2.1.2. Tecido adiposo subcutâneo caudal

O valor médio da $I_{450-510}$ ao abate foi diferente entre cordeiros P e C ($P < 0,001$), com média de $-111,69$ e $-69,55$ unidades para cordeiros P e C, respectivamente, variando de $-248,15$ a $-0,43$ unidades para cordeiros P e de $-228,62$ a $66,77$ unidades para cordeiros C. A distribuição de cordeiros P e C em diferentes classes de valores da integral do tecido adiposo subcutâneo caudal para medidas realizadas ao abate está apresentada na Figura 5 (a). A proporção de cordeiros P com média da $I_{450-510}$ maior que -120 unidades foi 57,31%, embora a proporção de cordeiros C com $I_{450-510}$ menor que -120 unidades foi 11,59%. Este limiar permitiu classificar corretamente 65,55% dos cordeiros quando a medida foi realizada no tecido adiposo subcutâneo caudal ao abate.

O valor médio da $I_{450-510}$ do tecido adiposo subcutâneo caudal após 24h de refrigeração diferiu entre os cordeiros P e C ($P < 0,001$), com média de $-236,88$ e $-155,39$ unidades para cordeiros P e C, respectivamente, variando de $-381,60$ a $-51,12$ unidades para cordeiros P e de $-289,23$ a $-36,47$ unidades para cordeiros C. A distribuição de cordeiros P e C em diferentes classes de valores da integral do tecido adiposo subcutâneo caudal para medidas realizadas após 24h de refrigeração está apresentada na Figura 5 (b). A proporção de cordeiros P com média da $I_{450-510}$ maior que -210 unidades foi 32,87%, embora a proporção de cordeiros C com $I_{450-510}$ menor que -210 unidades foi 7,32%. Este limiar permitiu classificar corretamente 79,91% dos cordeiros quando a medida foi realizada no tecido adiposo subcutâneo caudal após 24h de refrigeração.

3.2.2. Espectro de reflectância entre 400 e 700 nm (método 2)

3.2.2.1. Tecido adiposo perirenal

Este método permitiu classificar corretamente 79,72% e 95,12% (87,42% em média) das amostras do tecido adiposo perirenal ao abate para cordeiros P e C respectivamente. Após 24h de refrigeração, este método permitiu classificar corretamente 90,21% e 97,56% (93,89% em média) das amostras do tecido adiposo perirenal para cordeiros P e C respectivamente.

3.2.2.2. Tecido adiposo subcutâneo caudal

Este método permitiu classificar corretamente 94,41% e 91,46% (92,94% em média) das amostras do tecido adiposo subcutâneo caudal ao abate para cordeiros P e C respectivamente. Após 24h de refrigeração, este método permitiu classificar

corretamente 88,11% e 93,90% (91,00% em média) das amostras do tecido adiposo subcutâneo caudal para cordeiros P e C respectivamente.

3.2.3. Comparação entre os métodos de reflectância utilizados no tecido adiposo

O resultado obtido com o método 2 que utilizou todos os dados do espectro de reflectância entre 400 a 700 nm foi melhor ($P < 0,0001$) que aquele obtido com o método 1 que usou apenas os dados do espectro de reflectância entre 450 e 510 nm para calcular a $I_{450-510}$: considerando ambos os locais de medida, tempo de medida e tratamentos alimentares, a proporção de cordeiros corretamente discriminados foi 78,52% e 91,31% para o método 1 e 2, respectivamente.

Houve efeito do tratamento alimentar ($P < 0,0001$): a proporção de cordeiros corretamente classificados foi 78,06% e 91,77% para cordeiros P e C, respectivamente.

Houve efeito no local de medida ($P = 0,0001$): a proporção de cordeiros corretamente classificados foi 87,48% e 82,35% para o tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal, respectivamente. Houve também efeito no tempo de medida ($P < 0,0001$): a proporção de cordeiros corretamente classificados foi 81,51% e 88,33% para medidas realizadas ao abate e após 24h de refrigeração, respectivamente. Foi observada significativa interação entre fatores. As figuras 6 e 7 mostram os resultados obtidos utilizando ambos os métodos de discriminação sobre o tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal, para cordeiros P e C ao abate e após 24h de refrigeração, respectivamente. Para cordeiros P, o método 2 aumentou a proporção de cordeiros corretamente classificados comparado com o método 1, exceto para medidas feitas ao abate sobre o tecido adiposo perirenal, onde ambos os métodos apresentaram resultados semelhantes (79,72%). Para cordeiros C, não foi observada diferença entre os métodos de classificação, exceto para medidas determinadas ao abate sobre o tecido adiposo perirenal, onde o método 2 apresentou melhores resultados (95,12% vs 80,50%; $P < 0,001$). A maior diferença entre os métodos 1 e 2 foi observada para cordeiros P no tecido adiposo subcutâneo caudal ao abate, onde a proporção de cordeiros corretamente classificados foi de apenas 42,69% para o método 1, embora 94,41% para o método 2.

4. Discussão

4.1. Concentração dos carotenóides no plasma

Este estudo confirmou que os pigmentos carotenóides podem ser utilizados com sucesso para discriminar cordeiros em pasto e confinados, embora foi observada alta variabilidade dos dados. A concentração de carotenóides no plasma ao abate permitiu

discriminar corretamente 97,01% das amostras de plasma. A CCPA variou de 27 a 194 $\mu\text{g/L}$ para cordeiros em pasto, com amplitude similar a observada por Prache et al. (2003; 43 a 280 $\mu\text{g/L}$). O nível de ingestão de carotenóides provavelmente varia com a concentração de carotenóides da forragem, que pode ter variado amplamente, uma vez que as amostras de sangue foram coletadas a partir de Agosto até Novembro, nos anos de 2004 e 2005. Entretanto, para alguns dados, uma alta variabilidade entre animais pastejando o mesmo piquete foi também observada. Isso pode ser devido às variações individuais no nível de ingestão de forragem e na absorção de carotenóides e metabolismo (Rock, 1997). Em pastagens heterogêneas, isto pode ser explicado também pela variabilidade individual na escolha da dieta (Prache, Bechet & Damasceno, 2006).

4.2. Espectro de reflectância entre 450 e 510 nm

4.2.1. Tecido adiposo perirenal

A discriminação entre tratamentos alimentares utilizando a $I_{450-510}$ do tecido adiposo perirenal foi melhor quando as medidas foram realizadas após 24h de refrigeração da carcaça (88,51%) que ao abate (80,11%). Isto está em desacordo com os resultados de Priolo et al. (2002), que relataram redução do potencial de discriminação após 24h de refrigeração quando utilizaram o mesmo método. A diferença deve-se ao fato que no trabalho de Priolo et al. (2002), não foi cortada uma superfície plana sobre o tecido adiposo perirenal antes da realização das medidas com o espectrofotômetro portátil, entretanto, neste trabalho isso foi realizado o que permitiu uma perfeita aderência do tecido adiposo ao leitor do aparelho.

4.2.2. Tecido adiposo subcutâneo caudal

A discriminação entre tratamentos alimentares utilizando a $I_{450-510}$ do tecido adiposo caudal foi melhor quando as medidas foram realizadas após 24h de refrigeração (79,91%) que ao abate (65,55%). Estes resultados estão de acordo com Priolo et al. (2002), que observaram melhor discriminação utilizando dados obtidos após 24h refrigeração que ao abate, embora 50% dos cordeiros permaneceram mal discriminados.

Os resultados do presente estudo confirmam que o tecido adiposo perirenal é mais apropriado que o tecido adiposo subcutâneo caudal para discriminar cordeiros P e C, baseado na quantificação da absorção de luz pelos pigmentos carotenóides na região entre 450 e 510 nm do espectro de reflectância. O aumento no potencial de discriminação em ambos os locais de medida após 24h de refrigeração está provavelmente ligado ao aumento da concentração de pigmentos carotenóides no tecido adiposo devido à evaporação da água. O potencial de discriminação foi, entretanto,

menor neste estudo que em Priolo et al. (2002), usando o mesmo método. Isto pode ser devido à variabilidade entre raças (Limousine neste estudo, embora Ile de France em Priolo et al. (2002)). Outra explicação para a menor discriminação neste estudo seria a maior variabilidade no conteúdo de carotenóides na forragem, embora ela não tenha sido medida em ambos os estudos e também a maior variabilidade entre animais, considerando o grande número de animais no presente estudo. Estes resultados enfatizam o fato de que tais procedimentos de validação sobre um grande número de animais são essenciais. Em virtude da acumulação de carotenóides apresentar um componente genético (Sheath, Coulon & Young, 2001), a amplitude de variação da concentração de carotenóides no plasma e da $I_{450-510}$ em cordeiros P e C provavelmente varie entre raças. Portanto, o potencial dos correspondentes métodos para discriminar cordeiros P e C em interação com a raça, requer futura avaliação experimental.

4.3. Espectro de reflectância entre 400 e 700 nm

O espectro de reflectância do tecido adiposo de cordeiros em pasto pode ser distinguido de cordeiros alimentados com concentrado pela presença de absorção entre 450-510 nm, correspondendo à zona de absorção de luz pelos carotenóides (Prache & Theriez, 1999). De fato, diferenças na composição do tecido adiposo induzem em diferenças nas propriedades ópticas, portanto, as características espectrais do tecido adiposo podem ser utilizadas para autenticação da dieta. Levando em consideração todos os dados espectrais, na região entre 400 a 700 nm (método 2), observou-se melhora no potencial de discriminação em relação ao método 1, que leva em consideração apenas a região de absorção de luz pelos carotenóides (450-510 nm). Análises de todas as informações ópticas entre 400-700 nm por análises discriminantes apresentaram diferenças no tecido adiposo oriundos dos 2 tratamentos alimentares, o que permitiu classificar corretamente 87,42% e 92,94% das amostras de tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal quando as medidas foram realizadas ao abate e 93,89% e 91,00% das amostras do tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal quando as medidas foram realizadas após 24h de refrigeração. O aumento no potencial de discriminação é, portanto, maior para o tecido adiposo caudal que para o perirenal, e para medidas feitas ao abate comparado àquelas realizadas após 24h de refrigeração. Os mecanismos que fundamentam esta melhora são ainda desconhecidos. Além dos pigmentos carotenóides, a região visível é também característica dos pigmentos respiratórios. As faixas de absorção do espectro de reflectância do tecido adiposo (banda de Soret a 415-435 nm, faixas de absorção entre 540-580 nm) estão ligadas a

pigmentos heme, provavelmente aos resíduos de hemoglobina após o abate (Prache, Aurousseau, Thériez & Renerre, 1990; Swatland, 1989; Cozzolino, Murray, Scaife & Paterson, 2000). Entretanto, a caracterização espectral do tecido adiposo utilizando espectroscopia de reflectância visível para discriminar dietas alimentares não tem sido investigada, com exceção do trabalho de Prache & Theriez (1999), relacionado à zona de absorção dos pigmentos carotenóides.

5. Conclusões

Os resultados deste trabalho confirmaram que o método da concentração de carotenóides pode atuar como biomarcadores para traçar cordeiros com alimentação a base de forragem, ele permitiu discriminar 97,01% dos cordeiros. A caracterização espectral do tecido adiposo entre 450-510 nm, baseado nos pigmentos carotenóides, pode apresentar uma satisfatória classificação, dependendo do tempo de refrigeração e local de medida. Foi demonstrado que medidas feitas sobre o tecido adiposo perirenal e após 24h de refrigeração apresentaram os melhores resultados de discriminação (88,51%). Entretanto, a inclusão da informação entre 400 e 700 nm na região visível melhorou o potencial de discriminação, baseado no espectro de reflectância do tecido adiposo. Independente do local e tempo de medida, a proporção de cordeiros bem discriminados variou de 87,42% a 93,89%. Estes resultados são de interesse porque esta medida pode ser realizada rapidamente, sem prejudicar a linha de abate em frigoríficos comerciais. Todavia, como a tendência em acumular pigmentos carotenóides e outros compostos que afetam as propriedades ópticas do tecido adiposo, pode ter um fator genético, futuras pesquisas serão necessárias para investigar estes métodos em diferentes raças.

Literatura Citada

- Aurousseau, B., Bauchart, D., Calichon, E., Micol, D., & Priolo, A., (2004). Effect of grass or concentrate feeding systems and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the *M. longissimus thoracis* of lambs. *Meat Science*, 66(3), 531-541
- Cardinault, N., M. Doreau, C. Poncet, and P. Nozière. (2006). Digestion and absorption of carotenoids in sheep fed fresh red clover. *Animal Science*, 82, 49-55.

- Cozzolino, D., Murray, I., Scaife, J. R., & Paterson, R. (2000). Study of dissected lamb muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy for composition assessment. *Animal Science*, 70, 417-425.
- Daget, P., & Poissonnet, P. (1971). Une méthode d'analyse phytosociologique des prairies. Critères d'application. *Annales agronomiques*, 22(1), 5-41.
- Enser, M., Hallett, K. G., Hewett, B., Fursey, G. A. J., Wood, J. D., & Harrington, G. (1998). Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science*, 49(3), 329-341.
- European Council Directive n° 609 (1986).
- Fisher, A. V., & de Boer, H. (1994). The EAAP standard method of sheep carcass assessment. Carcass measurements and dissection procedures report of the EAAP working group on carcass evaluation, in cooperation with the CIHEAM instituto agronomico Mediterraneo of Zaragoza and the CEC Directorate General for Agriculture in Brussels. *Livestock Production Science*, 38(3), 149-159.
- Karijord, O. (1978). Correlation between the concentration of carotenoids in depot fat and in plasma of sheep. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 28, 355-359.
- Lyan, B., Azais-Braesco, V., Cardinault, N., Tyssandier, V., Borel, P., Alexandre-Gouabau, M. C., & Grolier, P. (2001). Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 751, 297-303.
- Martin, B., Cornu, A., Kondjoyan, N., Ferlay, A., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Rock, E., Chilliard, Y., Coulon, J. B., & Berdagué, J. L. (2005). Milk indicators for recognizing the types of forages eaten by dairy cows. In J. F. Hocquette, & S. Gigli, *Indicators of milk and beef quality*. (pp. 127-136). Proc. European Association of Animal Production Publication, n° 112, Bled, Slovenia.
- Nürnberg, K., Grumbach, S., Zupp, W., Hartung, M., Nürnberg, G., & Ender, K. (2001). Enhancing of n-3 fatty acids and conjugated fatty acid in lamb meat by keeping on pasture. *Fleishwirtschaft*, 81, 120-122.
- Patterson, D. S. P. (1965). The association between depot fat mobilization and the presence of xanthophyll in the plasma of normal sheep. *Journal of Agricultural Science*, 64, 273-278.

- Prache, S., Aurousseau, B., Thériez, M., & Renerre, M. (1990). Les défauts de couleur du tissu adipeux sous-cutané des carcasses d'ovins. *INRA Productions Animales*, 3, 275-285.
- Prache S., Bechet G., & Damasceno J. C. (2006). Diet choice in grazing sheep: a new approach to investigate the relationships between preferences and intake-rate on a daily time scale. *Applied Animal Behaviour Science*, 99(3-4), 253-270.
- Prache, S., & Theriez, M. (1999). Traceability of lamb production systems: carotenoids in plasma and adipose tissue. *Animal Science*, 69, 29-36.
- Prache, S., Priolo, A., Tournadre, H., Jailler, R., Dubroeuq, H., Micol, D., & Martin, B. (2002). Traceability of grass feeding by quantifying the signature of carotenoid pigments in herbivores meat, milk and cheese. In *Proceedings 19th General Meeting of the European Grassland Federation*, (pp. 592-593), La Rochelle, France, J. L. Durand; J. C. Emile; C. Huyghe & G. Lemaire (eds), AFPF.
- Prache, S., Priolo, A., & Grolier, P. (2003). Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: its significance for the traceability of grass-feeding. *Journal of Animal Science*, 81, 360-367.
- Prache S., Cornu A., Berdagué J. L., & Priolo A., (2005). Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research*, 59(2-3), 157-168.
- Priolo, A., Prache, S., Micol, D., & Agabriel, J. (2002). Reflectance spectrum to trace grass feeding in sheep: Influence of measurement site and shrinkage time after slaughter. *Journal of Animal Science*, 80, 886-891.
- Rock, C. L. (1997). Carotenoids: biology and treatment. *Pharmacology and Therapeutics*. 75(3), 185-197.
- Russel A. J. F., Doney, J. M., & Gunn, R. G. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal Agricultural Science*. 72, 451-454.
- SAS (1999). *SAS/STAT User's Guide*, Version 8. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Sheath G. W., Coulon J. B., & Young O. A., (2001). Grassland management and animal product quality. In: Gomide, J.A., Mattos, W.R.S., de Silva, S.C. (Eds), *Proceedings of the 19th International Grassland Congress on Grassland Ecosystems: An Outlook into the 21st Century*. (pp. 1019-1026). Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.

Swatland, H. J. (1989). Carotene reflectance and the yellowness of bovine adipose tissue measured with a portable fibre-optic spectrophotometer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46(2), 195-200.

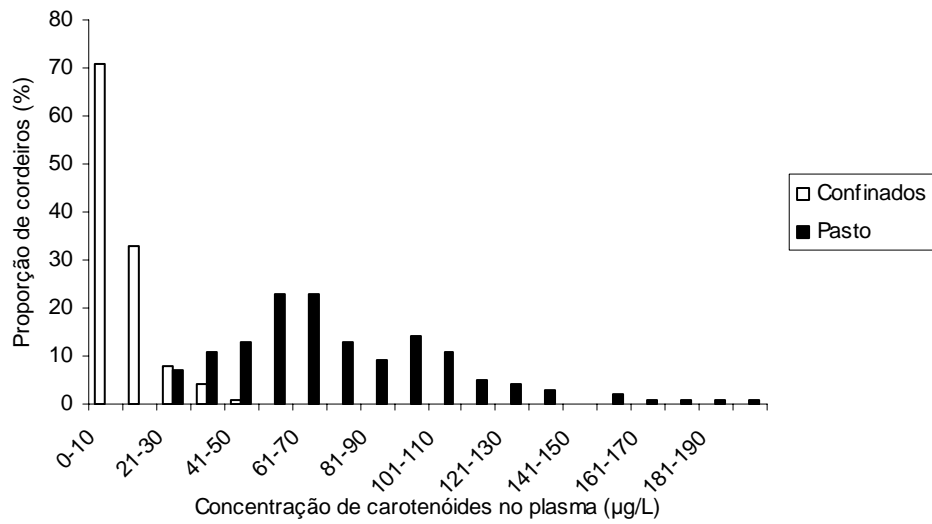
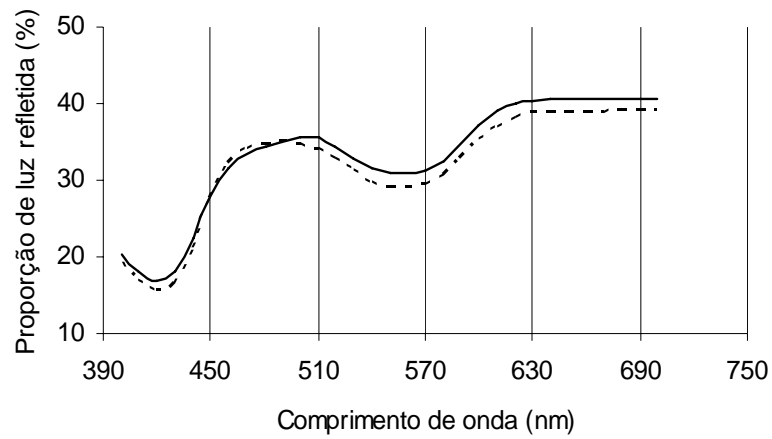


Figura 1. Distribuição da concentração de carotenóides no plasma de cordeiros em pasto e confinados.

(a)



(b)

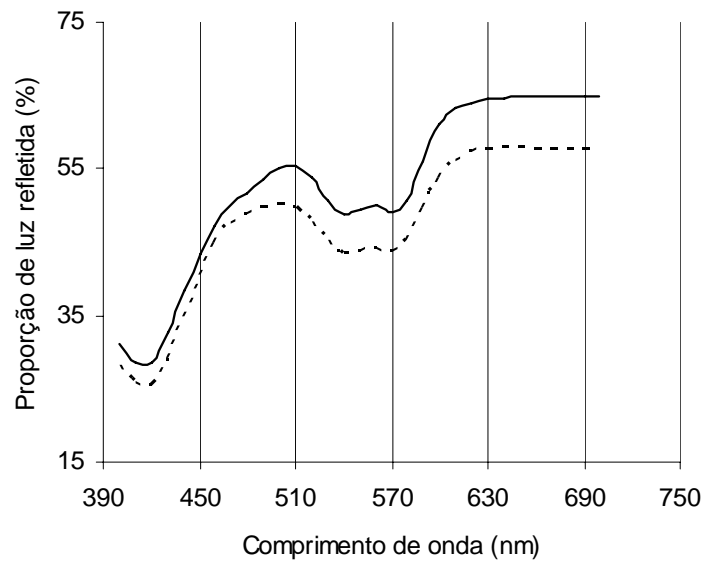
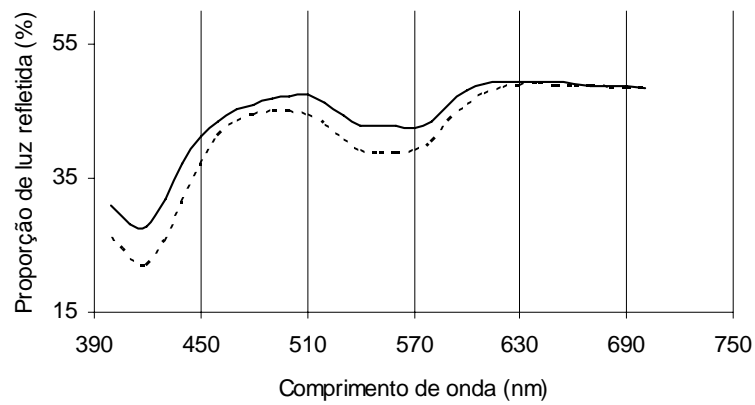


Figura 2. Espectro de reflectância médio entre 400 e 700 nm do tecido adiposo perirenal ao abate (a) ou após 24h de refrigeração (b). Cordeiros alimentados em pasto (—) e confinados (---).

(a)



(b)

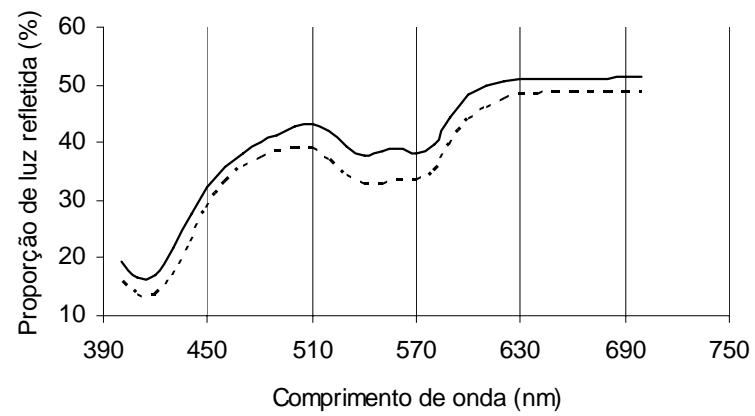
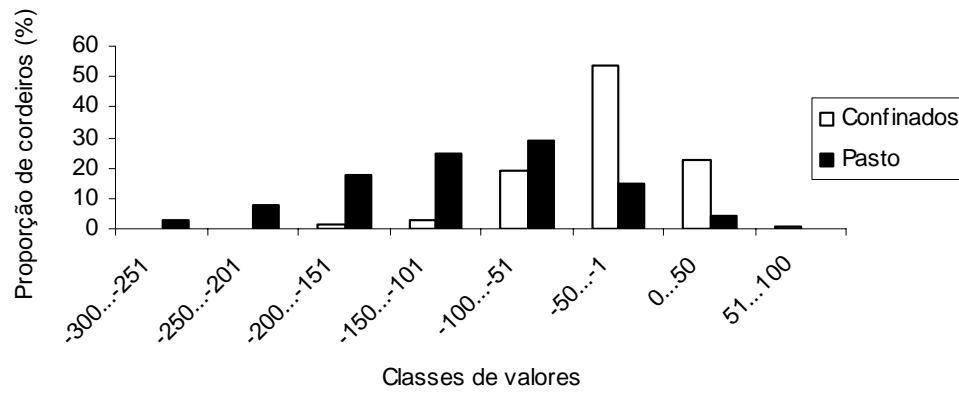


Figura 3. Espectro de reflectância médio entre 400 e 700 nm do tecido adiposo subcutâneo caudal ao abate (a) ou após 24h de refrigeração (b). Cordeiros alimentados em pasto (—) e confinados (---).

(a)



(b)

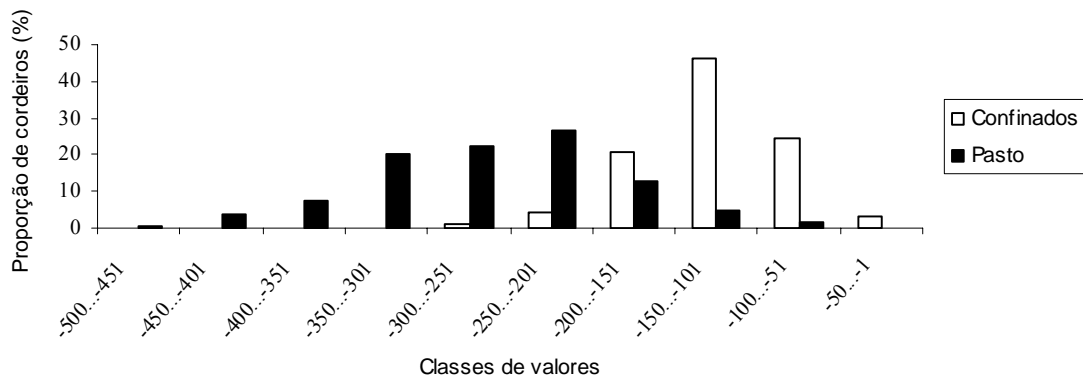


Figura 4. Distribuição de cordeiros alimentados em pasto e confinados em diferentes classes de valores da integral do espectro de reflectância entre 450-510 nm. Medidas realizadas no tecido adiposo perirenal ao abate (a) ou após 24h de refrigeração (b).

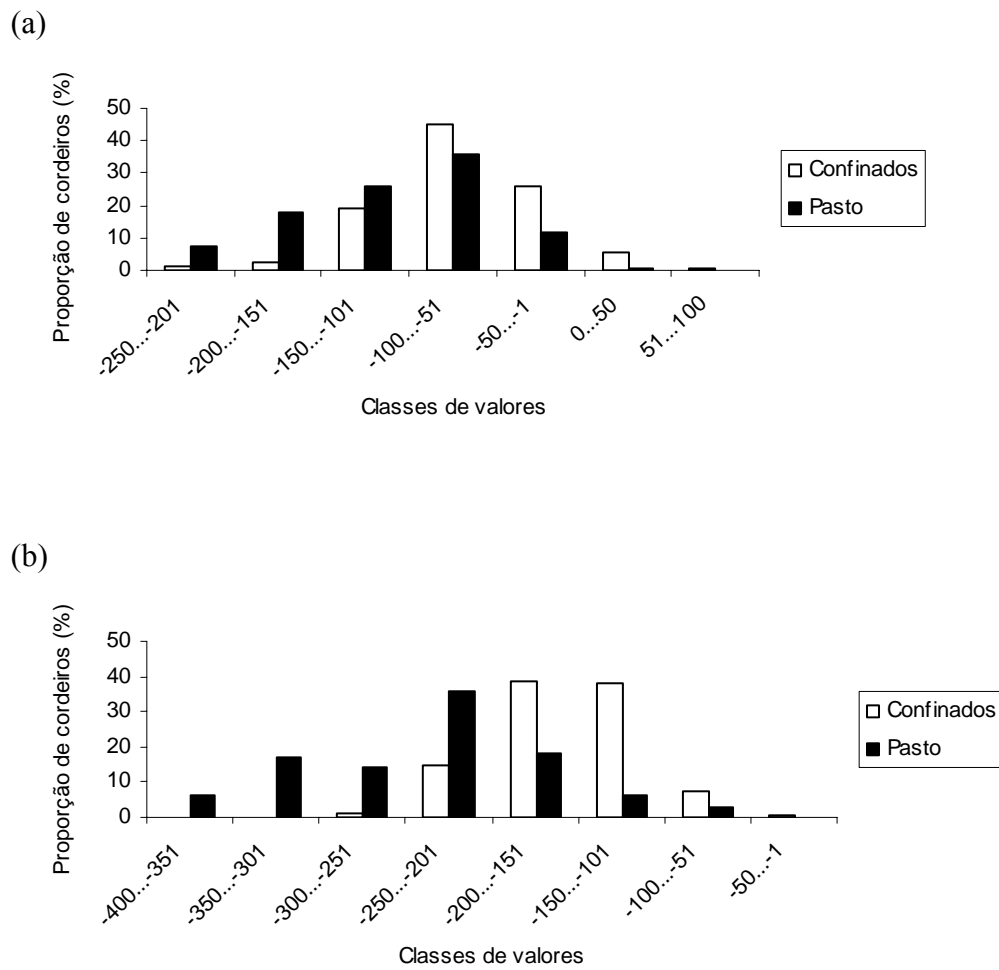


Figura 5. Distribuição de cordeiros alimentados em pasto e confinados em diferentes classes de valores da integral do espectro de reflectância entre 450-510 nm. Medidas realizadas no tecido adiposo subcutâneo caudal ao abate (a) ou após 24h de refrigeração (b).

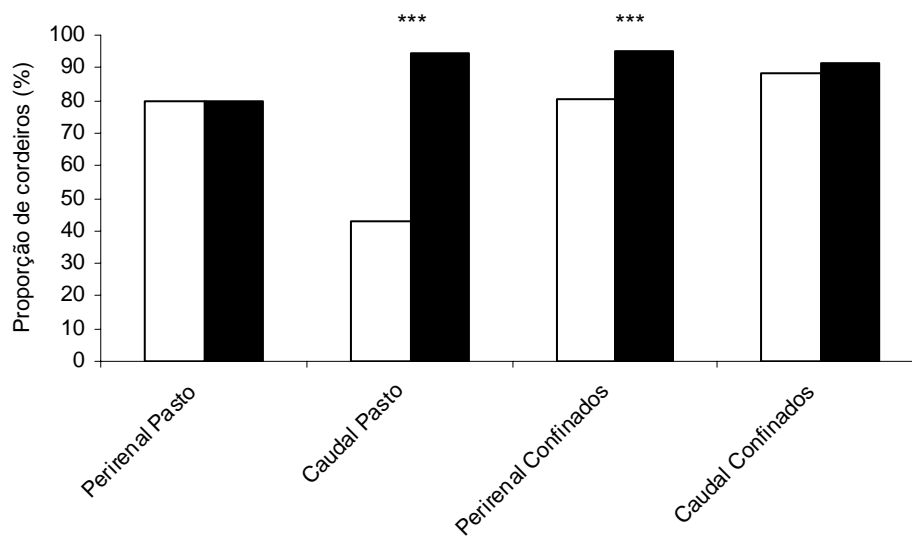


Figura 6. Proporção de cordeiros classificados corretamente usando o método 1 (valor da integral entre 450-510 nm) e método 2 (espectro de reflectância entre 400-700 nm) sobre o tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal ao abate. Símbolos abertos e sólidos referem-se ao método 1 e método 2, respectivamente. Perirenal Pasto, Caudal Pasto, Perirenal Confinamento e Caudal Confinamento referem-se a medidas realizadas no tecido adiposo perirenal ou subcutâneo caudal, em animais alimentados em pasto ou confinamento. *** Discriminação foi significativamente diferente a $P < 0,001$ entre ambos os métodos.

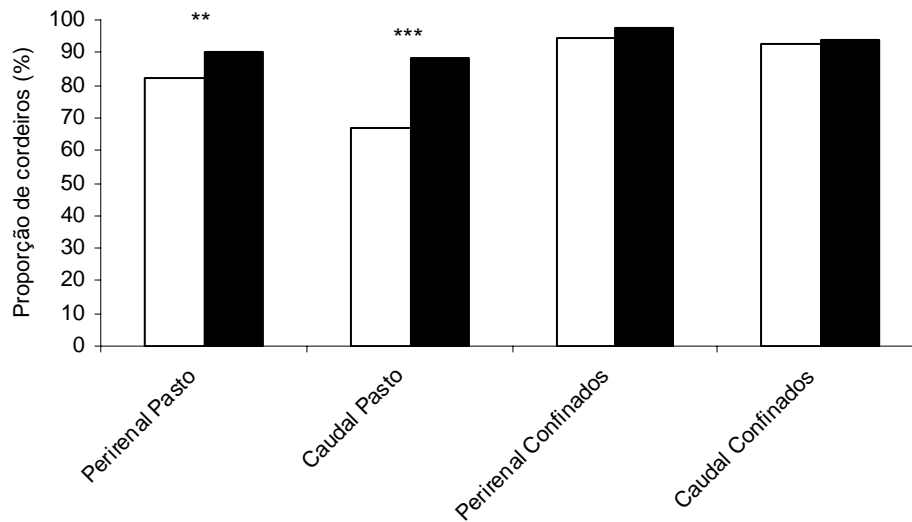


Figura 7. Proporção de cordeiros classificados corretamente usando o método 1 (valor da integral entre 450-510 nm) e método 2 (espectro de reflectância entre 400-700 nm) sobre o tecido adiposo perirenal e subcutâneo caudal após 24h de refrigeração. Símbolos abertos e sólidos referem-se ao método 1 e método 2, respectivamente. Perirenal Pasto, Caudal Pasto, Perirenal Confinamento e Caudal Confinamento referem-se às medidas realizadas no tecido adiposo perirenal ou subcutâneo caudal, em animais alimentados em pasto ou confinamento. **, *** Discriminação foi significativamente diferente a $P < 0,01$ e $P < 0,001$ entre ambos os métodos.

Tabela 1. Composição botânica da pastagem consumida por cordeiros alimentados em pasto (%)

<i>Taraxacum</i> sp.	37,9
<i>Trifolium repens</i>	29,0
<i>Dactylis glomerata</i>	8,3
<i>Bromus hordeaceus</i> ssp. <i>Hordeaceus</i>	6,0
<i>Lolium perenne</i>	4,9
<i>Elymus repens</i>	3,9
<i>Poa trivialis</i>	1,8
<i>Agrostis capillaries</i>	1,2
<i>Rumex crispus</i>	1,0
<i>Poa pratensis</i>	0,8
<i>Ranunculus acris</i>	0,8
<i>Veronica chamaedrys</i>	0,8
<i>Rumex obtusifolius</i>	0,8
<i>Cerastium fontanum</i> ssp. <i>Triviale</i>	0,7
<i>Heracleaum sphondylium</i>	0,7
<i>Holcus lanatus</i>	0,4
<i>Holcus mollis</i>	0,2
<i>Cruciata laevipes</i>	0,2
<i>Rumex acetosa</i>	0,2
<i>Alopecurus pratensis</i>	0,2
<i>Trifolium pratense</i>	0,1
<i>Trisetum flavescens</i>	0,1

Tabela 2. Composição do concentrado fornecido aos cordeiros confinados (g/kg)

Componentes	
Cevada	350,5
Farelo de soja	141,0
Polpa seca de açúcar de beterraba	110,0
Trigo	1000
Farelo de girassol	79,0
Trigo vermelho pequeno	81,0
Milho	60,0
Melaço de cana de açúcar	27,0
Carbonato de calico	17,0
Lignina	10,0
Minerais ¹ e vitaminas ²	8,0
Azeite de bagaço de uva	7,0
Cloreto de amônio	5,0
Sal	4,0
Aroma	0,5

¹14 g/kg de Ca, 4,5 g/kg de P, 150 mg/kg de Zn, 108 mg/kg de Fe, 50 mg/kg de Mn, 2 mg/kg de Co, 6,5 mg/kg de I, 0,182 mg/kg de Se.

²6000 UI/kg de vitamina A, 1200 UI/kg de vitamina D3, 20 UI/kg de vitamina E.

Tabela 3. Média das características (desvio padrão) dos cordeiros alimentados em pasto

Variável	
Número	143
Peso ao nascer (kg)	4,04 (0,667)
Peso vivo ao abate (kg)	33,2 (2,89)
Idade ao abate (d)	165 (28,1)
Ganho médio diário a partir do nascimento ao abate (g/d)	180 (40,0)
Peso da carcaça fria (kg)	14,34 (1,608)
Peso do tecido adiposo perirenal (g)	264 (105,8)
Espessura do tecido adiposo subcutâneo caudal (mm)	2,5 (0,84)

Tabela 4. Média das características (desvio padrão) dos cordeiros confinados

Variável	
Número	164
Peso ao nascer (kg)	3,73 (0,753)
Peso vivo ao abate (kg)	33,7 (3,62)
Idade ao abate (d)	111 (17,6)
Ganho médio diário a partir do nascimento ao abate (g/d)	276 (48,9)
Peso da carcaça fria (kg)	15,83 (1,835)
Peso do tecido adiposo perirenal (g)	296 (145,0)
Espessura do tecido adiposo subcutâneo caudal (mm)	3,5 (0,96)

Tabela 5. Concentração de carotenóides ($\mu\text{g/g MS}$) dos alimentos fornecidos aos cordeiros confinados

	Luteína	Beta-caroteno	Zeaxantina	Epiluteína	Carotenóides Totais
Concentrado	4,3	0,0	0,0	0,0	4,3
Feno de pastagem nativa da montanha	33,7	0,0	7,2	2,8	43,6

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo confirmou que os carotenóides são bons biomarcadores para traçar cordeiros com alimentação a base de forragem, embora alguma variabilidade individual na concentração de carotenóides no plasma e tecido adiposo foi sempre observada. As concentrações dos pigmentos carotenóides no sangue e tecido adiposo aumentaram linearmente com a ingestão média diária de carotenóides. Todavia, a inclusão de altos níveis de alfafa desidratada na dieta de ovinos confinados pode afetar a confiabilidade do método baseado nos carotenóides no plasma e tecido adiposo. Neste caso, futuras pesquisas combinando outros compostos moleculares e atômicos aos pigmentos carotenóides devem ser testados.

A caracterização espectral do tecido adiposo, entre 450-510 nm baseado nos pigmentos carotenóides, pode apresentar uma satisfatória classificação, dependendo do tempo de refrigeração e local de medida. Foi demonstrado que medidas feitas sobre o tecido adiposo perirenal e após 24h de refrigeração utilizando este método, apresentaram resultados mais confiáveis que aqueles obtidos sobre o tecido adiposo subcutâneo caudal e ao abate. Entretanto, a inclusão da informação entre 400 e 700 nm na região visível foi essencial para obter melhor potencial de discriminação com o espectro de reflectância. Futuras investigações serão necessárias para estabelecer o componente ou os componentes que expliquem a melhor autenticidade com o espectro de reflectância a comprimentos de onda entre 400 e 700 nm.

Anexo

A dose-response study relating the concentration of carotenoid pigments in blood and fat to carotenoid intake level in sheep

ABSTRACT: This study was conducted to describe the dose-response curve relating the concentration of carotenoid pigments in plasma and fat to the carotenoid intake level in sheep, and investigate how far incorporating dehydrated alfalfa in the diet could affect the reliability of the discrimination between concentrate-fed and pasture-fed lambs based on plasma and fat carotenoid assay. In Exp. 1, 6 treatments were compared in individually penned lambs: feeding 0, 250, 500, 750, 1,000 and 1,250 g of dehydrated alfalfa per d for 60 d before slaughter. Each treatment (T₀, T₂₅₀, T₅₀₀, T₇₅₀, T_{1,000} and T_{1,250}) comprised 8 male Romanov x Berrichon lambs with an initial average BW of 24.8 kg (s.e. 2.60). All the lambs received straw ad libitum and T₀ to T_{1,000} lambs received a concentrate free of green vegetative matter of which the supply was regulated to produce similar growth patterns in all treatments. In Exp. 2, 33 male Romanov x Berrichon lambs grazed a natural pasture maintained in a green vegetative stage and offered ad libitum for at least 59 d before slaughter. Initial BW when turning out to pasture was 14.2 kg (s.e. 2.34). Plasma carotenoid concentration was measured at slaughter by spectrophotometry. Reflectance spectrum, lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) were measured after 24h of shrinkage in the subcutaneous caudal and the perirenal fat. The spectra were translated to 0 reflectance at 510 nm and the integral of the translated spectrum was calculated between 450 and 510 nm (i.e., the range of light absorption by carotenoids). Reflectance measurement was replicated 5 times, from which we calculated the absolute value of the mean integral (AVMI). In Exp. 1, plasma carotenoid concentration at slaughter (PCCS) increased linearly with mean daily carotenoid intake (MDCI, $P < 0.001$). Both subcutaneous caudal and perirenal fat AVMI increased linearly ($P < 0.001$) with MDCI and PCCS, the slope of the regression being greater for perirenal than for subcutaneous caudal fat ($P < 0.05$ and $P < 0.005$ respectively). PCCS was greater for lambs of Exp. 2 than for lambs of either treatment of Exp. 1 ($P < 0.001$). We established the dose-response curves relating PCCS and AVMI of subcutaneous and perirenal fat to carotenoid intake level. We showed that the combined use of plasma carotenoid concentration at slaughter and perirenal

fat AVMI enabled to discriminate pasture-fed lambs from lambs receiving up to 500 g dehydrated alfalfa per d.

Key Words: Alfalfa, Carcasses, Carotenoids, Fat, Reflectance, Sheep

INTRODUCTION

One of the most important production factors affecting the composition of milk and meat from cattle, sheep and goats is the animal's diet. Its effects are due to specific compounds that are directly transferred from the feed to the end product or transformed or produced by ruminal microorganisms or the animal's metabolism in response to specific diets. In turn, some of these compounds can be used as diet markers to authenticate the diet (Prache et al., 2005; Martin et al., 2005). Carotenoid pigments are examples of such compounds. They are involved in the nutritional and sensory properties of herbivore products and have recently proved useful for diet authentication, particularly for distinguishing pasture-fed from grain-fed animals (Prache and Theriez, 1999; Prache et al., 2002; Prache et al., 2003a and b; Nozière et al., 2006a; Serrano et al., 2006). However, the carotenoid concentration in the animal tissues and products can be expected to range widely according to its supply in the diet. The purpose of this study was i) to establish the dose-response curve relating carotenoid concentration in plasma and fat to carotenoid intake level in sheep, by using individually penned lambs fed controlled levels of dehydrated alfalfa, and ii) to investigate how far incorporating dehydrated alfalfa in the diet of stall-fed lambs could reduce the reliability of the discrimination between concentrate-fed and pasture-fed lambs based on carotenoid concentration in plasma and fat.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted at the experimental farm of the INRA Center of Clermont-Ferrand Theix, France. The animals were handled by specialized personnel who cared for their welfare in accordance with the European Union Directive No. 609/1986.

Experimental Design, Animals and Diets

Exp. 1. Six levels of dehydrated alfalfa were compared: 0, 250, 500, 750, 1,000 and 1,250 g of dehydrated alfalfa per d. Each treatment (T0, T250, T500, T750, T1,000 and T1,250) comprised 8 male Romanov x Berrichon lambs, individually penned indoors and offered the feeding treatment for 60 d before slaughter. Forty-eight lambs were classified into eight blocks according to birth weight and average daily gain between birth and the beginning of the experiment. They were then assigned at random from within blocks to 1 of the 6 treatments. Mean lamb birth weight and daily gain between birth and the beginning of

the experiment were 4.11 kg (s.e. 0.941) and 309 g/d (s.e. 51.0); lambs weighed 24.8 kg (s.e. 2.60) at the beginning of the experiment. The animals were housed in a sheepfold from birth to slaughter and they were managed uniformly before the experiment. They were born on November 2 2004 on average and they received a commercial concentrate ad libitum from 3 weeks of age until the beginning of the experiment. The composition of the concentrate offered is given in Table 1. The dams were also kept indoors and they received hay ad libitum and a commercial concentrate containing no green vegetative matter. Lambs were progressively weaned from December 27 until the beginning of the experiment. The duration of Exp.1, therefore the duration of the alfalfa supply was similar for all the lambs to avoid confounding effects on pigment fixation intensity. To allow different slaughtering dates, the experiment started on January 6, January 8, January 13 and January 15 2005 with 12 animals on each date. During the experiment, lambs in T0 to T1,000 treatments received a commercial concentrate to achieve similar growth patterns in the 6 treatments. The feeding level of each T0, T250, T500, T750 and T1,000 lamb was adjusted every week to achieve a growth pattern similar to that of the corresponding T1,250 lamb in the same block. Thus lambs could be slaughtered at similar fatness level in all treatments, thereby avoiding the confounding effect of fatness level on carotenoid concentration in the fat (Prache et al, 2003b). The concentrate offered in Exp. 1 was similar to that fed previously from 3 weeks of age. During the first 2 weeks of the experiment, the T1,250 lambs also received 100 g per d of the commercial concentrate (on a as-fed basis) to bring about a feeding transition and adaptation. Straw was supplied ad libitum to all the lambs. Dehydrated alfalfa and straw were offered in the morning to ensure the consumption of the assigned dehydrated alfalfa level, and the concentrate was offered in the afternoon. Feed tubs were emptied every morning and feed refusals were weighed, recorded and discarded daily. Samples of offered alfalfa, concentrate and straw were taken twice weekly for DM and carotenoid concentration estimations.

Exp. 2. Thirty-three male Romanov x Berrichon lambs born in March were pasture-fed. They grazed, from 24 April until slaughter, a natural pasture that was always maintained at a leafy green vegetative stage and offered ad libitum. The lambs received no supplementation. The botanical composition of the pasture was (DM basis) *Lolium perenne* (29.8%), *Dactylis glomerata* (28.6%), *Festuca arundinacea* (20.7%), *Taraxacum officinale*

(10.0%), *Bromus sterilis* (9.9%), *Trifolium repens* (0.7%), and *Ranunculus macrophyllus* (0.3%). Lambs weighed 14.2 kg (s.e. 2.34) when turning out to pasture at a mean age of 38 d (s.e. 1.4). The duration of the grazing period ranged from 59 to 136 d. Most of the lambs were twin suckled. Weaning took place on 28 June. Lambs were slaughtered when they had attained a satisfactory degree of fatness, which was manually assessed by skilled technicians according to the method of Russel et al. (1969), in order to obtain a subcutaneous fat thickness on the cold carcass ranging from 2 to 3 mm.

In both experiments, water and salt blocks were always available. The salt blocks contained (g/kg, on an as-fed basis) 60 Ca, 20 P, 10 Mg, 280 Na, 17.5 Zn, 1.5 Fe, 5.5 Mn, 0.03 Co, 0.03 I, and 0.01 of Se.

Slaughter Procedures. All the lambs from both experiments were slaughtered. In Exp. 1, the lambs were fed their assigned experimental diet for 60 d, so there were four slaughter sessions on 7, 9, 14 and 16 March. Lambs were slaughtered in the morning and were not fed on the day of slaughter. In Exp. 2, lambs were slaughtered between 22 June and 7 September. They were transported by truck to the slaughterhouse, which was located within 500 m of the stall and the pasture. Immediately after their arrival, the lambs were slaughtered by throat cut. The carcasses were placed in a refrigerated room set at 4°C until 24h post mortem and they were always kept in the dark.

Measurements

Carotenoid Concentration in Feed. Carotenoids of alfalfa, concentrate and straw were extracted using the procedure described by Cardinault et al (2006). Lipophilic components of 50 mg of lyophilised and ground food were first extracted with acetone and then purified with diethyl ether containing echinenone as internal standard. After saponification and cleaning with water, carotenoids were then analysed by HPLC using the method described by Lyan et al (2001). The HPLC apparatus consisted of a Waters Alliance 2996 HPLC system with photodiode array detector monitoring between 280 and 600 nm. Carotenoids were separated on a 150 x 4.6 mm, RP C18, 3 µm, Nucleosil column coupled with a 250 X 4.6 mm, RP C18, 5 µm, Vydac TP 54 column (Interchim, Montluçon, France). Millennium 32 software from Waters SA (Saint Quentin en Yvelines, France) was used for instrument control, data acquisition and data processing. Wavelength detection for carotenoids was 450 nm, and the compounds were identified by comparing retention times

and spectral analyses with those of pure standard (> 95%). Concentrations of each compound were calculated using external standard curves and were then adjusted by percent recovery of the added internal standard.

Plasma Carotenoid Concentration. Plasma carotenoid concentration was measured for all lambs at slaughter. Blood samples were taken from the jugular vein of each lamb at 0800. Plasma was stored at -20°C until required for assay. Extraction of carotenoids from plasma was performed within 3 mo after sampling.

Crude estimation of total carotenoids was obtained by a spectrophotometric procedure using the following method. Protein from 3 mL of plasma diluted with 2 mL of distilled water was precipitated with 4 mL of ethanol. Carotenoids were then extracted with 4 mL of hexane. Absorption of the upper layer obtained after centrifugation at $5,000 \times g$ for 5 min was measured between 600 and 400 nm using a Kontron Uvikon 860 recording spectrophotometer (Kontron Instruments S.A., Montigny-le-Bretonneux, France). The concentration of total carotenoids was calculated from absorption maxima (Karijord, 1978), assuming a value of 2,500 for the E1% extinction coefficient (Patterson, 1965; Karijord, 1978) and allowing for the dilution of the original sample. Care was taken throughout the experimental and analytical procedure to protect samples from natural light (samplings and test tubes wrapped in aluminium foil to keep light out and extraction under dim artificial light).

Animal Characteristics at Slaughter. Lambs were weighed just before slaughter. Carcass weight, perirenal fat weight and subcutaneous fat thickness were measured after 24h shrinkage. Perirenal fat together with kidneys was removed from both carcass halves. The fat was separated from the kidneys using a knife and then weighed. The cold carcass was weighed before removal of these items. Subcutaneous fat thickness was measured by making two incisions through the fat along lines extending 4 cm ventro-laterally from the dorsal mid line at the last rib and, at the limit of that cut, extending 4 cm cranially. A flap of fat was raised and subcutaneous fat thickness was measured at the intersection of the incisions (Fisher and de Boer, 1994).

Reflectance Spectrum of Perirenal and Caudal Fat. We measured the reflectance spectra of subcutaneous caudal and perirenal fat at wavelengths between 700 and 400 nm and color coordinates expressed as lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) in the

CIELAB uniform colour space (CIE, 1986), using a MINOLTA CM-2002 spectrophotometer (illuminant D₆₅, observer angle 10°). This apparatus measures the proportion of light reflected every 10 nm. Measurements were made after 24h shrinkage. For perirenal fat, a plane surface was obtained with a knife to allow perfect adherence of the fat to the eye of the apparatus (Priolo et al., 2002b). For each site of fat deposition, 5 measurements were made.

Data Analysis. The reflectance spectrum between 510 and 450 nm was translated to make the reflectance value at 510 nm zero (**TR**). On the translated spectrum, the integral value was calculated as follows:

$$I_{450-510}, \text{TR.nm} = [(TR_{450} / 2) + TR_{460} + TR_{470} + TR_{480} + TR_{490} + TR_{500} + (TR_{510} / 2)] \times 10$$

The integral value was averaged over the 5 measurements. The mean integral values were all negative; hereafter we use the absolute value of the mean integral (**AVMI**). The variance of AVMI and plasma carotenoid concentration was stabilized using logarithmic transformation. Data were subjected to analysis of variance using the GLM procedure of Statistical Analysis Systems Institute (SAS, 1999), to examine the effect of the feeding treatment and animal block, and using the Student-Newman-Keuls multiple range test for pairwise comparisons. We used orthogonal contrasts to examine whether the responses of plasma carotenoid concentration at slaughter (**PCCS**, µg/L), of AVMI and of b* value of the fat to the feeding treatment had a linear or a curvilinear relation to the mean daily carotenoid intake level (**MDCI**, mg). As lutein is the only carotenoid stored in the fat of sheep (Yang et al., 1992; Prache et al., 2003b), we also examined whether the response of AVMI and of b* value of the fat to the feeding treatment had a linear or a curvilinear relation to the mean daily lutein intake level (**MDLI**, mg). Regression analysis of AVMI and b* value of the fat on PCCS were carried out using the GLM procedure of SAS (SAS, 1999).

RESULTS

Animal characteristics in Exp.1 are summarized in Table 2. Average daily gain from birth to slaughter, age at slaughter and perirenal fat weight did not differ between treatments ($P = 0.254$, 0.083 and 0.076 , respectively). Slaughter weight differed between treatments ($P = 0.005$), but carcass weight did not ($P = 0.527$). Subcutaneous fat thickness

was lower in T1,000 than in T0 (2.1 vs 3.5 mm, $P < 0.05$). All these characteristics varied significantly between blocks of lambs.

In Exp. 2, lamb liveweight and age at slaughter averaged 40.1 kg (s.e. 4.95) and 153 d (s.e. 22.3) respectively. Lamb growth rate between birth and slaughter averaged 240 g/d (s.e. 38), even though most of the lambs were twin suckled, this demonstrating that the pasture quality and availability were favourable to the expression of voluntary intake. The carcass weight, perirenal fat weight and subcutaneous fat thickness averaged 17.34 kg (s.e. 2.569), 0.220 kg (s.e. 0.1103) and 2.2 mm (s.e. 0.75) respectively.

Carotenoid Intake Level

In Exp. 1, the carotenoid concentration in dehydrated alfalfa, concentrate and straw were 280.6, 2.3 and 2.0 $\mu\text{g/g DM}$, respectively (Table 3). Lutein was the predominant carotenoid (71.3%, 91.3% and 100% of total carotenoid pigments in dehydrated alfalfa, concentrate and straw, respectively). Mean daily intake of dehydrated alfalfa was 99.2%, 99.0%, 99.9%, 98.1% and 95.8% of the assigned levels for T250, T500, T750, T1,000 and T1,250 respectively (Table 4). The differences between actual and assigned levels occurred mainly at the beginning of the experiment. MDCI and MDLI increased linearly ($P < 0.001$) with the mean daily dehydrated alfalfa intake level.

Plasma Carotenoid Concentration

In Exp. 1, PCCS ranged from 0 to 6, 4 to 14, 12 to 39, 13 to 64, 40 to 65, and from 28 to 95 $\mu\text{g/L}$ for T0, T250, T500, T750, T1,000 and T1,250. It was affected by the treatment ($P < 0.001$, Table 4), but not by the animal block. It was greater for T500, T750, T1,000 and T1,250 than for T250 and T0, and greater for T250 than for T0. The response of PCCS to the feeding treatment had a linear relation to MDCI ($P < 0.001$, Figure 1), without any quadratic effect ($P = 0.784$), the equation of regression for the mean data of 8 animals being:

$$\text{PCCS} = 0.38 \text{ (s.e. 2.501)} + (0.2052 \text{ (s.e. 0.01364)}) \times \text{MDCI} \quad (1)$$

Where $r^2 = 0.98$, residual standard deviation (r.s.d.) = 3.387, $n = 6$

The intercept was not different from 0 ($P = 0.885$).

In Exp. 2, PCCS averaged 112 $\mu\text{g/L}$ (s.e. 9.6), ranging from 43 to 258 $\mu\text{g/L}$. PCCS was greater for lambs of Exp. 2 than for lambs of either treatment of Exp. 1 ($P < 0.001$). There was no overlapping in the frequency distribution of the plasma carotenoid

concentration at slaughter of pasture-fed lambs in Exp. 2 and lambs receiving up to 500 g dehydrated alfalfa per d in Exp. 1. Half of the T750 lambs had values greater than 43 µg/L. The majority of T1,000 and T1,250 (13 out of 16 lambs) had values greater than 43 µg/L, i.e. in the range observed in pasture-fed lambs.

Reflectance Spectrum between 450 and 510 nm and Colour of the Fat

In Exp. 1, the AVMI of subcutaneous caudal fat ranged from 114.04 to 236.40, 131.56 to 269.50, 160.14 to 286.38, 133.61 to 325.39, 218.50 to 381.41 and 217.84 to 390.82 units for T0, T250, T500, T750, T1,000 and T1,250, respectively. The AVMI of perirenal fat ranged from 78.94 to 213.65, 110.75 to 269.20, 162.63 to 266.45, 231.64 to 354.45, 263.80 to 373.39 and 182.69 to 410.51 units for T0, T250, T500, T750, T1,000 and T1,250, respectively.

Both subcutaneous caudal and perirenal fat AVMI were affected by the treatment ($P < 0.001$ for both sites, Table 4), but not by the animal block. AVMI of subcutaneous caudal fat was greater for T1000 and T1250 than for T0 and T250. AVMI of perirenal fat was greater for T750, T1,000 and T1,250 than for T0, T250 and T500; it was greater for T500 than for T0. AVMI of perirenal fat did not differ significantly for T750, T1,000 and T1,250; it did not differ significantly for T250 and T500. The response of AVMI to the treatment had a linear relation to MDCI ($P < 0.001$ for both sites, Figure 2), without any quadratic effect ($P = 0.832$ and $P = 0.350$ for subcutaneous and perirenal fat, respectively). Similarly, the response of AVMI to the treatment had a linear relation to MDLI ($P < 0.001$ for both sites, Figure 3), without any quadratic effect ($P = 0.832$ and $P = 0.350$ for subcutaneous and perirenal fat, respectively). The regression equation varied with the site of measurement, with a common intercept, but a greater slope for perirenal than for subcutaneous caudal fat ($P < 0.05$), the equation of regression for the mean data of 8 animals being:

$$\text{AVMI} = 172.23 \text{ (s.e. 9.017)} + a \text{ (s.e. 0.05622)} \text{ MDCI} \quad (2)$$

Where $r^2 = 0.91$, r.s.d. = 17.27, $n = 12$, $a = 0.3783$ and 0.5322 for subcutaneous caudal and perirenal fat respectively.

$$\text{AVMI} = 171.93 \text{ (s.e. 9.045)} + b \text{ (s.e. 0.07891)} \text{ MDLI} \quad (3)$$

Where $r^2 = 0.91$, r.s.d. = 17.27, $n = 12$, $b = 0.5316$ and 0.7470 for subcutaneous caudal and perirenal fat respectively.

Both subcutaneous caudal and perirenal fat AVMI increased linearly ($P < 0.001$ for both sites) with PCCS, without any quadratic effect ($P = 0.101$ and $P = 0.250$ for subcutaneous and perirenal fat, respectively) (Figure 4). The regression equation of AVMI on PCCS varied with the site of measurement, with a common intercept, but a greater slope for perirenal than for subcutaneous caudal fat ($P < 0.005$), the equation of regression for the mean data of 8 animals being:

$$\text{AVMI} = 170.56 \text{ (s.e. 6.899)} + c \text{ (s.e. 0.2072)} \text{ PCCS} \quad (4)$$

Where $r^2 = 0.95$, r.s.d. = 13.18, $n = 12$, $c = 1.8686$ and 2.6199 for subcutaneous caudal and perirenal fat respectively.

All lambs receiving up to 500 g dehydrated alfalfa per d in Exp.1 had values for perirenal fat AVMI lower than 270 units, whereas 28 out of 33 pasture-fed lambs in Exp.2 had values for perirenal fat AVMI greater than 270 units. For T750, T1,000 and T1,250, 19 out of 24 lambs had values for perirenal fat AVMI greater than 270 units.

In Exp.1, there was no significant effect of the animal block on L^* , a^* , and b^* values of subcutaneous caudal and perirenal fat. There was no significant effect of the treatment on L^* , a^* , and b^* values of subcutaneous caudal fat nor on a^* value of perirenal fat (Table 5). The L^* value of perirenal fat tended to increase with increasing level of dehydrated alfalfa ($P = 0.07$). The b^* value of perirenal fat was affected by the treatment ($P < 0.01$). It was greater for T1,000 and T750 than for T500. The response of the b^* value of perirenal fat to the treatment had a linear relation to MDCI and MDLI ($P < 0.01$ in both cases), without any quadratic effect ($P = 0.972$ in both cases).

In Exp. 2, the subcutaneous caudal and perirenal fat AVMI averaged 293.16 (s.e. 14.437) and 373.82 (s.e.19.958) units, ranging from 129.65 to 470.85 and from 195.45 to 629.25 respectively. The b^* value of subcutaneous caudal and perirenal fat averaged 15.80 (s.e. 0.549) and 14.70 (s.e 0.404), ranging from 6.79 to 21.55 and 10.01 to 19.87 respectively.

DISCUSSION

In Exp. 1, the feeding management successfully ensured i) mean daily intake of dehydrated alfalfa reaching 95.8% to 99.9% of the assigned levels, and ii) a similar average daily gain and perirenal fat deposition for all treatments, therefore avoiding confounding effect of fatness level on carotenoid concentration in the fat (Prache et al, 2003b).

The carotenoid concentration in dehydrated alfalfa was 280.6 $\mu\text{g/g DM}$, i.e. about 40 to 65% of the concentrations observed by Prache et al. (2003a) in pasture herbage (432.9 to 696.6 $\mu\text{g/g DM}$). This lower level compared with pasture herbage is probably due to the dehydration process (Nozière et al., 2006b). However, it is worth noting that the carotenoid profile was different between dehydrated alfalfa and pasture herbage, and particularly that lutein accounted for 71% of total carotenoid pigments in dehydrated alfalfa against only 54 to 60% in pasture herbage (Prache et al., 2003a). This is important because lutein is the only carotenoid stored in the fat of sheep (Yang et al., 1992; Prache et al., 2003b). Dehydrated alfalfa was therefore a good model to study the dose-response curve relating the concentration of lutein in the fat to the daily lutein intake in sheep. Although the carotenoid intake level was probably lower than in pasture-fed lambs, (i) the proportion of lutein was greater in dehydrated alfalfa than in the pasture herbage of Prache et al. (2003a), and (ii) both the lutein concentration in the diet and the lutein intake level could be easily controlled in individually penned lambs. β -carotene accounted for 14% of total carotenoid pigments in dehydrated alfalfa against 22 to 26% in the pasture herbage of Prache et al. (2003a). The contribution of zeaxanthin was almost similar in both types of forages, i.e. 8% in dehydrated alfalfa and 6 to 9% in the pasture herbage of Prache et al. (2003a). If we assume that grazing lambs are eating about 1 kg DM herbage at the time of slaughter (Delagarde et al., 2001), and the lutein concentration of pasture herbage is about 252 mg/kg DM at this time (Prache et al., 2003a), then the daily lutein intake observed in this study for T1,250 lambs was about 16% lower than for pasture-fed lambs at the time of slaughter.

In Exp. 1, mean plasma carotenoid concentration increased linearly with MDCI, and our Eq. 1 enables predictions. However, mean plasma carotenoid concentration was much lower in T1,250 than in pasture-fed lambs (59 vs. 112 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.001$) presumably owing to differences in carotenoid intake level.

In Exp. 1, the AVMI in both subcutaneous caudal and perirenal fat increased with MDCI and MDLI. Our linear Eq. 2 and 3 enable to predict AVMI from the level of carotenoid or lutein intake. The intercept of the regression equation was similar for both measurement sites, but the slope was greater for perirenal than for subcutaneous caudal fat. This result is in line with previous studies reporting that the carotenoid concentration (Kirton et al., 1975) or the AVMI (Priolo et al., 2002b) was greater in perirenal than in subcutaneous caudal fat.

The perirenal fat AVMI was not significantly different between T750, T1,000 and T1,250 lambs. This raised the question of whether a plateau was reached from T750 onwards or whether this result was due to variability between replicates in lutein absorption. We did not detect any significant quadratic effect in the response curve. Moreover, combining the results of Exp. 1 and 2 provides evidence in support of a linear relationship. The subcutaneous and perirenal fat AVMI of the pasture-fed lambs in Exp. 2 averaged 293.16 and 373.82, respectively. Using Eq. 3, the corresponding daily lutein intake level may be predicted to reach 230-270 mg, in line with the expected herbage intake level in pasture-fed lambs and the lutein concentration in pasture herbage obtained by Prache et al (2003a). Finally, the relationship between AVMI and PCCS remains quite linear when pooling data from the two experiments, i.e. when adding data from pasture-fed lambs in which mean PCCS was much greater than for lambs in Exp. 1 (Figure 5). The regression equation for the mean data then becomes:

$$\text{AVMI} = 190.34 \text{ (s.e. 9.977)} + d \text{ PCCS} \quad (5)$$

Where $r^2 = 0.88$, r.s.d. = 23.22, $n = 14$, $d = 1.1192$ (s.e. 0.21440) and 1.8569 (s.e. 0.21294) for subcutaneous caudal and perirenal fat respectively.

However, it should be noted that the carotenoid intake level in Exp. 2 was more subject to variations than in Exp. 1, because of likely variations in carotenoid concentration in pasture herbage and in intake level.

The data of the present study enable to propose equations to predict mean concentration of carotenoid pigments in the plasma and mean fat AVMI from mean daily carotenoid intake level. This dose-response study may therefore shed some light on questions regarding the effects of sward availability, sward carotenoid content and concentrate supplementation at pasture on the carotenoid concentration in plasma and fat in

pasture-fed lambs, which are all factors that can affect the animal's carotenoid intake level. Further work is however needed to study the interaction of the dose-response curve with factors that may affect the animal's response, such as growth pattern and breed.

In previous studies, it was observed that the fat was slightly more yellow in pasture-fed than in concentrate-fed lambs (Priolo et al 2002a), owing to carotenoid pigments. In this study, we showed that the b^* value of perirenal fat increased linearly with MDCI and MDLI despite a large inter-individual variability.

The data in the present study actually clearly show the level of the inter-individual variability in carotenoid absorption and storage. Although carotenoid intake level was similar for all lambs within treatment levels in Exp. 1, some inter-individual variability in plasma and fat carotenoid concentrations was observed. In T1,250 lambs for example, plasma carotenoid concentration ranged from 28 to 95 $\mu\text{g/L}$ (i.e. a 3.4-fold variation), and AVMI for perirenal fat ranged from 182.69 to 410.51 units (i.e. a 2.3-fold variation).

Prache and Theriez (1999) were the first to find that carotenoids in plasma and fat could be used as markers of pasture-feeding in sheep, and this result was confirmed in subsequent experiments comparing pasture-fed to concentrate-fed sheep and cattle (Prache et al., 2002; Priolo et al., 2002b; Prache et al., 2003a and b; Serrano et al., 2006). However, it was uncertain whether and to what extent the inclusion of dehydrated alfalfa (and more generally of green vegetative matter) in concentrates could affect the reliability of the discrimination between pasture-fed and concentrate-fed lambs. Actually, feeding alfalfa indoors does not have the same 'natural' connotation in the popular sense as pasture-feeding. This study helps answer this question. The combined use of all the plasma and perirenal fat data for individual animals in both experiments (Figure 6) enabled to discriminate all the pasture-fed lambs from all those receiving up to 500 g dehydrated alfalfa per d. All 24 lambs receiving up to 500 g dehydrated alfalfa per d presented values for plasma carotenoid concentration at slaughter and AVMI of perirenal fat lower than 40 $\mu\text{g/L}$ and 270 units respectively, values that were never observed in the 33 pasture-fed lambs of Exp. 2. Lambs presenting values for plasma carotenoid concentration at slaughter greater than 95 $\mu\text{g/L}$ or values for AVMI of perirenal fat greater than 411 units were all pasture-fed (15 over 33 pasture-fed lambs). However, there was some overlapping in the distribution of pasture-fed and lambs fed more than 500 g dehydrated alfalfa per d indoors.

The inclusion in grain-based concentrates of high levels of dehydrated alfalfa may therefore affect the reliability of the pasture feeding authentication method based on carotenoids in plasma and fat. However, it can be argued that alfalfa-based concentrate diets may affect the sensorial attributes of sheepmeat. Young et al. (2003) observed that a concentrate diet incorporating 780 g/kg of dried alfalfa generated greater levels of branched-chain fatty acids in the fat of sheep than pasture feeding, thus affecting the flavour of the meat. Finally, other molecular and atomic compounds together with fingerprint approaches could be combined with carotenoid pigments to further improve the reliability of diet authentication (Prache et al., 2005). This we pursue in future research with pasture-fed, grain-fed and dehydrated alfalfa-fed lambs to i) compare the sensorial attributes of the meat and ii) combine several compounds for diet authentication issues.

IMPLICATIONS

We demonstrate that the concentrations of carotenoid pigments in both plasma and fat increase linearly with mean daily carotenoid intake. This study confirms that carotenoid fixation is lower in subcutaneous caudal fat than in perirenal fat. Although the carotenoid intake level was similar for all the lambs within treatment levels, some inter-individual variability in plasma and fat carotenoid concentration was still observed. We show that the combined use of plasma and perirenal carotenoid concentrations can discriminate pasture-fed lambs from lambs receiving up to 500 g of dehydrated alfalfa per d indoors. However, the inclusion of greater levels of dehydrated alfalfa in the diet of stall-fed lambs may affect the reliability of the method based on carotenoid pigments in plasma and fat used to authenticate pasture-feeding in sheep. In this case, future research directed towards combining other molecular and atomic compounds to carotenoid pigments will be useful.

LITERATURE CITED

- Cardinault, N., M. Doreau, C. Poncet, and P. Nozière. 2006. Digestion and absorption of carotenoids in sheep fed fresh red clover. *Anim. Sci.* 82: 49-55.
- CIE. 1986. Colorimetry. 2nd ed. CIE Publ. No 15.2. Commission International de l'Eclairage, Vienna.

- Delagarde, R., S. Prache, M. Petit, and P. D'Hour. 2001. Ingestion de l'herbe par les ruminants au pâturage. *Fourrages*, 189-212.
- European Council Directive n° 609 (1986).
- Fisher, A. V., and H. de Boer. 1994. The EAAP standard method of sheep carcass assessment. Carcass measurements and dissection procedures. Report of the EAAP Working Group on Carcass Evaluation, in cooperation with the CIHEAM Instituto Agronomico Mediterraneo of Zaragoza and the CEC Directorate General for Agriculture in Brussels. *Livest. Prod. Sci.* 38:149-156.
- Karijord, O. 1978. Correlation between the content of carotenoids in depot fat and in plasma of sheep. *Acta Agric. Scand.* 28:355-359.
- Kirton, A. H., B. Crane, D. J. Paterson, and N. T. Clare. 1975. Yellow fat in lambs caused by carotenoids pigmentation. *N. Z. J. Agric. Res.* 18:267-272.
- Lyan, B., V. Azais-Braesco, N. Cardinault, V. Tyssandier, P. Borel, M. C. Alexandre-Gouabau, and P. Grolier. 2001. Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.* 751:297-303.
- Martin, B., A. Cornu, N. Kondjoyan, A. Ferlay, I. Verdier-Metz, P. Pradel, E. Rock, Y. Chilliard, J. B. Coulon, and J. L. Berdagué. 2005. Milk indicators for recognizing the types of forages eaten by dairy cows. Pages 127-136 in *Indicators of Milk and Beef Quality*. J. Hocquette, and S. Gigli, ed. Proc. Europ. Assoc. Anim. Prod. No. 112, Bled, Slovenia.
- Nozière, P., P. Grolier, D. Durand, A. Ferlay, P. Pradel, and B. Martin. 2006a. Variation of carotenoids, fat-soluble micronutrients and color in cow's plasma and milk following changes in forage and feeding level. *J. Dairy Sci.* 89:2634-2648.
- Nozière, P., B. Graulet, A. Lucas, B. Martin, P. Grolier, and M. Doreau. 2006b. Carotenoids in ruminants: from forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, doi:10.1016/j.anifeedci.2006.06.018.
- Patterson, D. S. P. 1965. The association between depot fat mobilization and the presence of xanthophyll in the plasma of normal sheep. *J. Agric. Sci.* 64:273-278.
- Prache, S., and M. Theriez. 1999. Traceability of lamb production systems: carotenoids in plasma and adipose tissue. *Anim. Sci.* 69:29-36.

- Prache, S., A. Priolo, H. Tournadre, R. Jailler, H. Dubroeuq, D. Micol, and B. Martin. 2002. Traceability of grass feeding by quantifying the signature of carotenoid pigments in herbivores meat, milk and cheese. Pages 592-593 in Proc. 19th Gen. Meet. Eur. Grassl. Fed., La Rochelle, France.
- Prache, S., A. Priolo, and P. Grolier. 2003a. Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: its significance for the traceability of grass-feeding. *J. Anim. Sci.* 81:360-367.
- Prache, S., A. Priolo, and P. Grolier. 2003b. Effect of concentrate finishing on the carotenoid content of perirenal fat in grazing sheep: its significance for discriminating grass-fed, concentrate-fed and concentrate-finished grazing lambs. *Anim. Sci.* 77:225-233.
- Prache, S., A. Cornu, J. L. Berdagué and A. Priolo. 2005. Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Rumin. Res.* 59:157-168.
- Priolo, A., D. Micol, J. Agabriel, S. Prache, and E. Dransfield. 2002a. Effect of grass or concentrate feeding systems on lamb carcass and meat quality. *Meat Sci.* 62:179-185.
- Priolo, A., S. Prache, D. Micol, and J. Agabriel. 2002b. Reflectance spectrum to trace grass feeding in sheep: Influence of measurement site and shrinkage time after slaughter. *J. Anim. Sci.* 80:886-891.
- Russel A. J. F., J. M. Doney, and R. G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci., Camb.* 72:451-454.
- SAS (1999). *SAS/STAT User's Guide*, Version 8. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Serrano, E., S. Prache, B. Chauveau, P. Pradel, J. Agabriel, and D. Micol. 2006. Traceability of grass-feeding in young beef using carotenoid pigments in plasma and adipose tissue. *Anim. Sci.*, in press.
- Yang, A., T. W. Larsen, and R. K. Tume. 1992. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 43:1809-1817.
- Young, O. A., G. A. Lane, A. Priolo, and K. Fraser. 2003. Pastoral and species flavour in lambs raised on pasture, lucerne or maize. *J. Sci. Food Agric.* 83:93-104.

Table 1. Composition of concentrate dispensed to lambs in Exp. 1 (g/kg on an as-fed basis)

Components	
Barley	200.0
Wheat	120.0
Wheat red shorts	50.0
Legume seed hulls	50.0
Wheat bran	150.0
Soybean meal	88.0
Malt sprouts	21.0
Dried sugar beet pulp	150.0
Cocoa beet shells	44.0
Sugar beet molasses	40.0
Formalin	3.5
Calcium carbonate, sodium chloride, ammonium chloride, minerals ¹ and vitamins ²	83.5

¹ 14 g/kg of Ca, 4.5 g/kg of P, 150 mg/kg of Zn, 108 mg/kg of Fe, 50 mg/kg of Mn, 2 mg/kg of Co, 6.5 mg/kg of I, 0.182 mg/kg of Se.

² 6,000 UI/kg of vitamin A, 1,200 UI/kg of vitamin D3, 20 UI/kg of vitamin E.

Table 2. Animal characteristics in Exp. 1

	Dehydrated alfalfa level offered (g/d)						SEM	<i>P</i>
	0	250	500	750	1,000	1,250		
Avg daily gain ¹ , g/d	246	235	231	242	247	254	20.5	0.254
Slaughter age, d	130	130	129	130	132	131	1.8	0.083
Slaughter wt, kg	38.4ab	37.6b	37.8b	38.4ab	39.2a	39.3a	0.99	0.005
Carcass wt, kg	16.21	15.59	15.53	15.49	15.38	15.30	0.998	0.527
Subcutaneous fat thickness, mm	3.5a	2.6ab	2.6ab	2.7ab	2.1b	2.6ab	0.72	0.021
Perirenal fat wt, kg	0.137	0.087	0.116	0.105	0.092	0.102	0.0345	0.076

¹ from birth to slaughter

Table 3. Carotenoid concentration ($\mu\text{g/g DM}$) of the feed offered in Exp. 1

	Lutein	Beta-carotene	Zeaxanthin	Epilutein	Total carotenoids
Dehydrated alfalfa	200.2	38.8	23.0	18.6	280.6
Concentrate	2.1	0.0	0.1	0.2	2.4
Straw	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0

Table 4. Mean daily dehydrated alfalfa, concentrate and straw intake level, mean daily carotenoid and lutein intake level, mean plasma carotenoid concentration at slaughter, and mean value of AVMI¹ of perirenal and subcutaneous caudal fat after 24h shrinkage in Exp. 1

	Dehydrated alfalfa level offered (g/d)						SEM	<i>P</i>
	0	250	500	750	1,000	1,250		
Mean daily alfalfa intake, g/d	0	247	495	749	981	1196	16.2	< 0.001
	f	e	d	c	b	a		
Mean daily concentrate intake, g/d	1072	724	434	249	76	25	124.2	< 0.001
	a	b	c	d	e	e		
Mean daily straw intake, g/d	153	157	211	223	201	162	40.72	< 0.001
	b	b	ab	a	ab	b		
Mean daily carotenoid intake, mg/d	2.40	63.07	123.93	186.51	243.55	296.80	4.010	< 0.001
	f	e	d	c	b	a		
Mean daily lutein intake, mg/d	2.21	45.36	88.70	133.28	173.89	211.84	2.864	< 0.001
	f	e	d	c	b	a		
log (plasma carotenoid concentration, µg/L)	1.107	2.156	3.124	3.657	3.943	4.017	0.7588	< 0.001
	c	b	a	a	a	a		
log (AVMI ¹ of subcutaneous caudal fat, units)	5.1600	5.2072	5.3720	5.4277	5.6623	5.5723	0.2364	< 0.001
	b	b	ab	ab	a	a		
log (AVMI ¹ of perirenal fat, units)	5.1163	5.2498	5.4049	5.6838	5.7478	5.7150	0.2273	< 0.001
	c	bc	b	a	a	a		

Within a row, values with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

¹ AVMI: absolute value of the mean integral of the translated spectrum between 450 and 510 nm

Table 5. Mean lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) of subcutaneous caudal and perirenal fat after 24h shrinkage in Exp. 1

	Dehydrated alfalfa offered (g/d)						SEM	<i>P</i>
	0	250	500	750	1,000	1,250		
Subcutaneous caudal fat								
L^*	68.24	68.27	71.06	68.45	73.04	70.38	3.712	0.073
a^*	2.398	2.927	1.488	2.340	1.812	1.473	1.634	0.427
b^*	14.66	15.57	14.07	15.18	15.46	15.25	2.214	0.759
Perirenal fat								
L^*	69.13	70.51	72.55	72.83	73.66	74.17	3.680	0.070
a^*	4.775	3.816	2.918	4.756	4.339	3.548	2.339	0.565
b^*	13.47ab	13.63ab	12.66b	15.51a	15.60a	14.84ab	1.750	0.006

Within a row, values with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

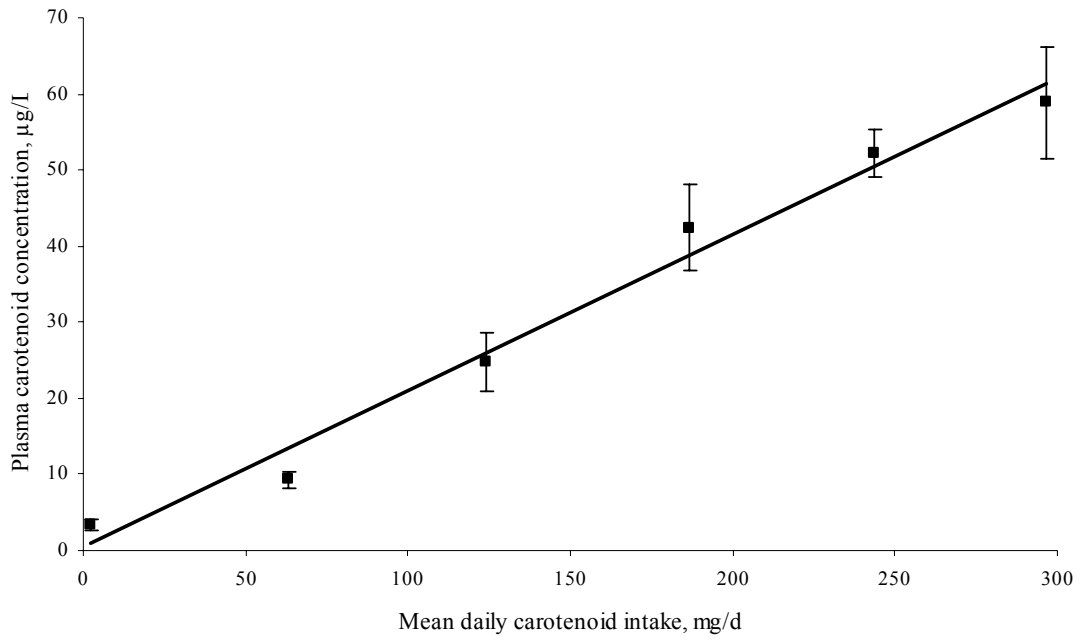


Figure 1.

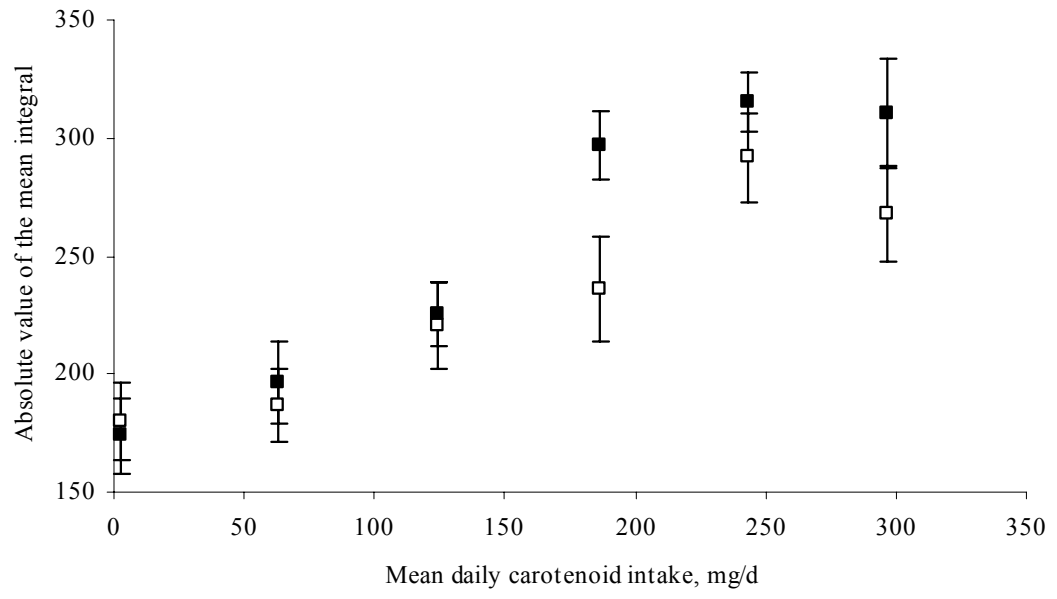


Figure 2.

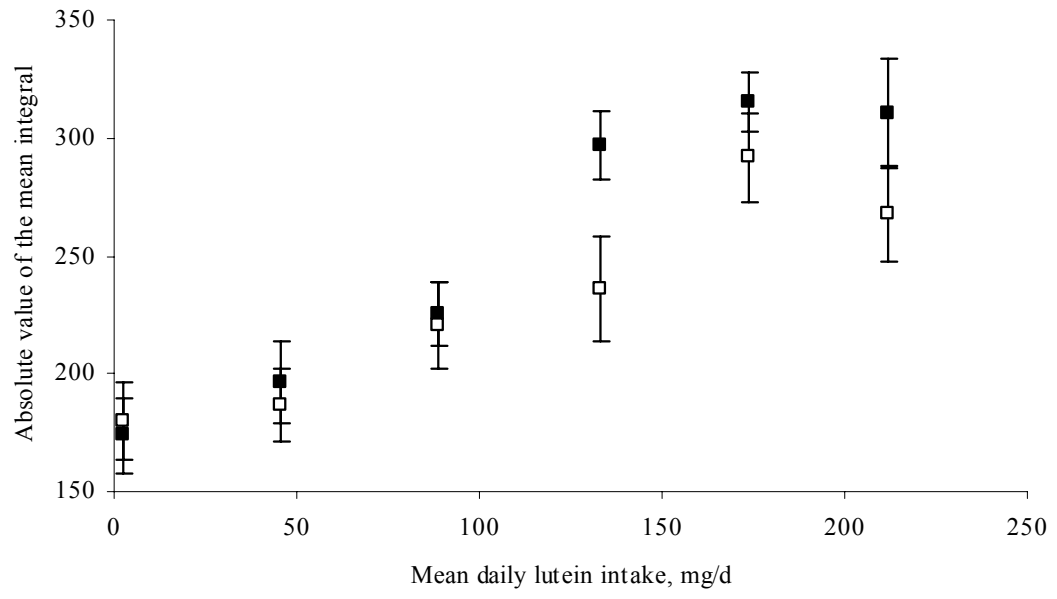


Figure 3.

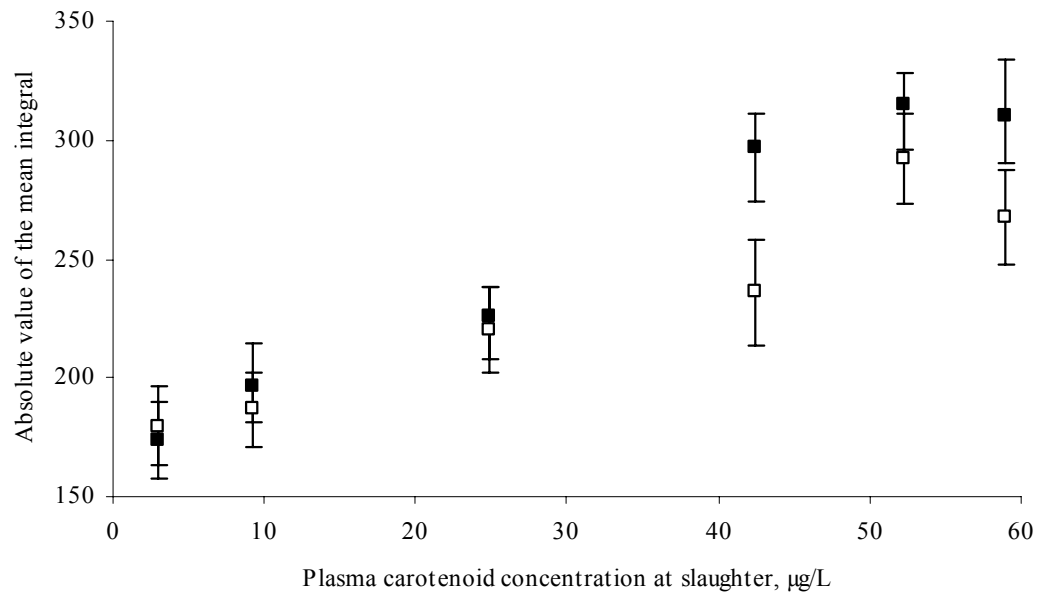


Figure 4.

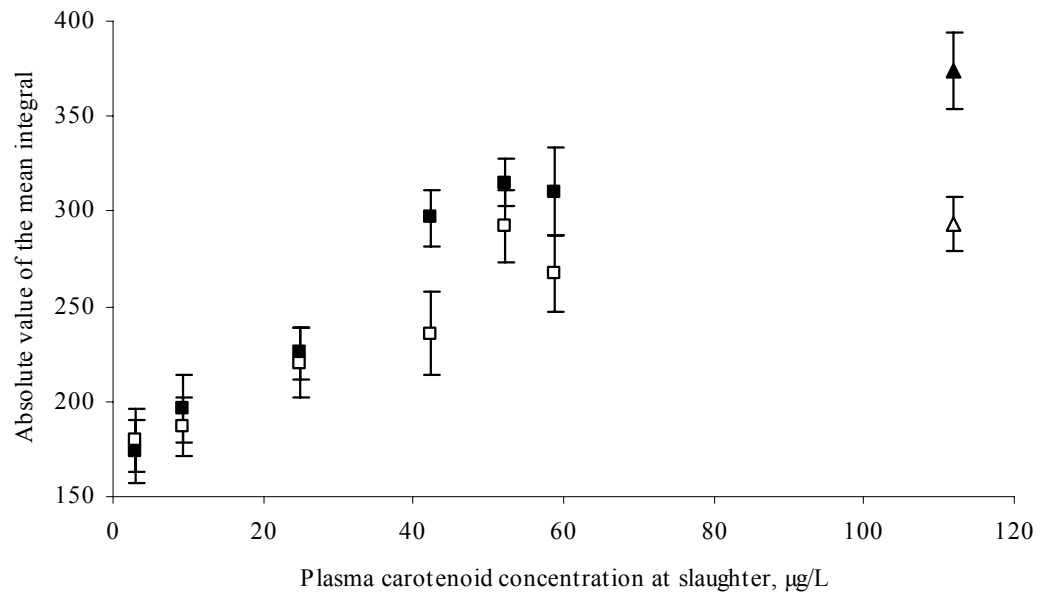


Figure 5.

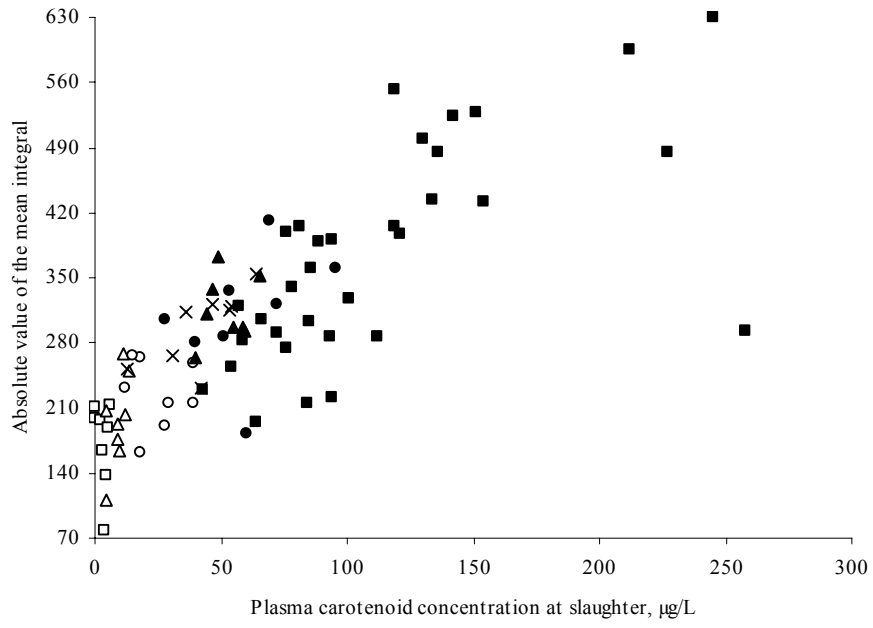


Figure 6.

Figure 1. Dose-response curve relating mean plasma carotenoid concentration at slaughter to mean daily carotenoid intake level in Exp. 1. Bars represent standard errors.

Figure 2. Dose-response curve relating absolute value of the mean integral between 450 and 510 nm (AVMI) for subcutaneous caudal (□) and perirenal (■) fat and to mean daily carotenoid intake level in Exp. 1. Bars represent standard errors.

Figure 3. Dose-response curve relating absolute value of the mean integral between 450 and 510 nm (AVMI) for subcutaneous caudal (□) and perirenal (■) fat to mean daily lutein intake level in Exp. 1. Bars represent standard errors.

Figure 4. Response curve relating absolute value of the mean integral between 450 and 510 nm (AVMI) for subcutaneous caudal (open symbols) and perirenal (solid symbols) fat to mean plasma carotenoid concentration at slaughter in Exp. 1. Bars represent standard errors.

Figure 5. Response curve relating absolute value of the mean integral between 450 and 510 nm (AVMI) for subcutaneous caudal (open symbols) and perirenal (solid symbols) fat to mean plasma carotenoid concentration at slaughter. Squares and triangles refer to Exp. 1 and 2 respectively. Bars represent standard errors.

Figure 6. Distribution of lambs according to plasma carotenoid concentration at slaughter and absolute value of the mean integral between 450 and 510 nm (AVMI) for perirenal fat, in Exp. 1: T0 (□), T250 (Δ), T500 (○), T750 (x), T1,000 (▲) and T1,250 (●) and in Exp. 2 (■, pasture-fed lambs).

Validation and developments in the use of visible reflectance spectroscopy and carotenoid pigments for diet authentication in lambs

Abstract

Plasma carotenoid concentration and visible reflectance spectroscopy in the range 400-700 nm or 450-510 nm (i.e., the zone of light absorption by carotenoid pigments) were used to discriminate pasture- (P) v. stall-fed (S) lambs. A total of 307 (143 P and 164 S) Limousine lambs were used over 2 years. Duration of the grazing period for P lambs ranged from 94 to 187 days. Plasma carotenoid concentration was measured at slaughter. Reflectance spectrum of perirenal and subcutaneous caudal fat was measured at slaughter and after 24h shrinkage. Plasma carotenoid concentration enabled the correct classification of 97.01% of the lambs. The reliability of the discrimination was higher when using the fat reflectance data between 400 and 700 nm than between 450 and 510 nm ($P < 0.0001$). With measurements made on perirenal fat after 24h shrinkage, the proportion of correctly classified lambs was 88.51% and 93.89% for each method respectively.

Keywords: authentication; carcass; carotenoid; fat; pasture-feeding; reflectance; sheep

1. Introduction

Recent studies (Enser, Hallett, Hewett, Fursey, Wood & Harrington, 1998; Nürnberg, Grumbach, Zupp, Hartung, Nürnberg & Ender, 2001; Aurousseau, Bauchart, Calichon, Micol & Priolo, 2004) have demonstrated that meat from pasture-fed ruminants has a fatty acid composition thought to be more beneficial to human health, compared to meat from animals fed concentrate diets. Furthermore, there is a consumer demand for clear information regarding the food supplied to animals, and an increased consumer interest in the “green image” of animal products (Prache & Theriez, 1999). It is therefore important to be able to discriminate between products obtained in different production systems; in particular pasture- vs. stall-feeding.

Recently, efforts have been made to develop analytical tools to quantify specific compounds in the product or the animal tissues that can act as tracers of the type of food given to animals (Prache, Cornu, Berdagué & Priolo, 2005; Martin et al., 2005).

Carotenoid pigments have been shown to be good biomarkers of pasture feeding in sheep (Prache & Theriez, 1999; Prache et al., 2002; Priolo, Prache, Micol & Agabriel, 2002). Plasma carotenoid concentration was successfully used to discriminate between pasture-fed and stall-fed lambs (Prache, Priolo & Grolier, 2003). Furthermore, Prache & Theriez (1999) proposed a mathematical analysis of the reflectance spectrum of the fat between 450 and 510 nm (i.e., the zone of light absorption by carotenoids) to quantify the signature of these pigments. This latter method is of obvious practical interest since it is non-invasive, fast and easily implemented in the meat industry with a portable spectrophotometer. However, these initial studies were made with a small number of animals and demonstrated a high variability in the animal’s response. Thus, validation of the results with a large number of animals was necessary. Moreover, using the whole reflectance spectrum, i.e., all the 400-700 nm reflectance data, may provide further valuable information and better discrimination.

The purpose of this study was i) to utilise a large number of animals to validate the potential use of carotenoid pigments in plasma and fat for the discrimination of pasture-fed and stall-fed lambs, ii) to further explore the potential use of the reflectance spectrum of the fat, by using the whole reflectance data in the zone 400 to 700 nm.

2. Materials and methods

This study was carried out over 2 years (2004 and 2005) at the experimental farm of the Unité Expérimentale des Mont Dore, Site d'Orcival, of the INRA Center of Clermont-Ferrand Theix, France. The animals were handled by specialized personnel who cared for their welfare according to the European Union Directive No. 609/1986.

2.1. Experimental design

Two feeding treatments were compared: pasture- vs. stall-feeding. Pasture-fed lambs (P) grazed a green vegetative pasture without supplements from turning out to pasture in May until slaughter which ranged between August and November in both years. Stall-fed lambs (S) were fed *ad libitum* with concentrate and hay indoors. Lambs were slaughtered when they had attained a satisfactory degree of fatness, which was manually assessed by skilled technicians according to the method of Russel, Doney & Gunn (1969).

2.2. Animals and diets

A total of 307 Limousine lambs were used; 143 were pasture-fed (81 males and 62 females) and 164 were stall-fed (86 males and 78 females). One hundred and thirty-four lambs were slaughtered in 2004 (43 S and 91 P) and 173 lambs were slaughtered in 2005 (121 S and 52 P).

Pasture-fed lambs were born in April (04 to 24 April 2004, 06 to 24 April 2005, except one lamb that was born on 17 May 2005). They were provided natural pasture *ad libitum* from 3 May in 2004 and 12 May in 2005 until slaughter, which occurred between 4 August and 4 November in 2004 and between 17 August and 3 November in 2005. The pasture sward was maintained at a leafy, green, vegetative state. The botanical composition of the pasture, (Table 1) was assessed visually using the method of Daget and Poissonet (1971). Lambs weighed 9.2 kg (s.e. 2.21) when turning out to pasture at a mean age of 22 d (s.e. 6.5), except one lamb that was born at pasture. They were weaned on 26 July 2004 and on 25 July 2005. Pasture-fed lambs received no supplementation at pasture. Stall-fed lambs slaughtered in 2004 were born between 12 November 2003 and 12 April 2004 and S lambs slaughtered in 2005 were born between 17 November 2004 and 11 April 2005. They were fed commercial concentrate and natural pasture hay indoors. The composition of the concentrate offered is given in Table 2. Weaning took place on 25 February 2004 and 18 March 2005. Samples of hay and concentrate offered to the animals were taken twice

weekly for the estimation of carotenoid content. In both treatments, water and salt blocks were always available.

2.3. Slaughter procedures

Animals were transported to the abattoir by truck. Immediately after their arrival, they were slaughtered by throat cut. The carcasses were placed in a chiller at 4°C until 24h post-mortem and they were always kept in the dark.

2.4. Measurements

2.4.1. Carotenoid concentration in feed

Carotenoids in the concentrate and hay were extracted using the procedure described by Cardinault et al (2006). Lipophilic components of 50 mg of lyophilised and ground food were first extracted with acetone and then purified with diethyl ether containing echinenone as internal standard. After saponification and cleaning with water, carotenoids were then analysed by HPLC using the method described by Lyan et al (2001). The HPLC apparatus consisted of a Waters Alliance 2996 HPLC system with photodiode array detector monitoring between 280 and 600 nm. Carotenoids were separated on a 150 x 4.6 mm, RP C18, 3 µm, Nucleosil column coupled with a 250 x 4.6 mm, RP C18, 5 µm, Vydac TP 54 column (Interchim, Montluçon, France). Millenium 32 software from Waters SA (Saint Quentin en Yvelines, France) was used for instrument control, data acquisition and data processing. Wavelength detection for carotenoids was 450 nm, and the compounds were identified by comparing retention times and spectral analyses with those of pure standard (> 95%). Concentrations of each compound were calculated using external standard curves and were then adjusted by percent recovery of the added internal standard.

2.4.2. Crude estimation of total plasma carotenoids

Blood, for the measurement of plasma carotenoid concentration was obtained from all lambs the day before slaughter. Blood samples were taken from the jugular vein of each lamb in the morning. Plasma was stored at -20°C until required for assay. Extraction of carotenoids from plasma was performed within 3 months after sampling.

Crude estimation of total carotenoids in the plasma was obtained by a spectrophotometric procedure using the following method. Protein from 3 mL of plasma diluted with 2 mL of distilled water was precipitated with 4 mL of ethanol. Carotenoids were then extracted with 4 mL of hexane. Absorption of the upper layer obtained after

centrifugation at $5,000 \times g$ for 5 min was measured between 600 and 400 nm using a Kontron Uvikon 860 recording spectrophotometer (Kontron Instruments S.A., Montigny-le-Bretonneux, France). The concentration of total carotenoids was calculated from absorption maxima (Karijord, 1978), assuming a value of 2,500 for the E1% extinction coefficient (Patterson, 1965; Karijord, 1978) and allowing for the dilution of the original sample. Care was taken throughout the experimental and analytical procedure to protect samples from natural light (samplings and tests tubes wrapped in aluminium foil to keep light out and extraction under dim artificial light).

2.4.3. Animal characteristics at slaughter

Lambs were weighed just before slaughter. Carcass weight, perirenal fat weight and subcutaneous fat thickness were measured after 24h shrinkage. Perirenal fat and the kidneys were removed from the carcass. The fat was separated from the kidneys using a knife and then weighed. The cold carcass was weighed before removal of these items. Subcutaneous fat thickness was measured by making two incisions through the fat along lines extending 4 cm ventro-laterally from the dorsal mid line at the last rib and, at the limit of that cut, extending 4 cm cranially. A flap of fat was raised and subcutaneous fat thickness was measured at the intersection of the incisions (Fisher & de Boer, 1994).

2.4.4. Reflectance spectrum of perirenal and subcutaneous caudal fat

The reflectance spectrum of perirenal and subcutaneous caudal fat of all lambs was measured at wavelengths between 400 and 700 nm, using a MINOLTA CM-2002 spectrophotometer (illuminant D65, observer angle 10°). This apparatus measures the proportion of light reflected every 10 nm. Three replicates of the measurement were made at slaughter and also after 24h of shrinkage. For the measurements made on perirenal fat after 24h shrinkage, a plane surface was obtained with a knife to allow perfect adherence of the fat to the eye of the apparatus.

The quantification of light absorption by carotenoid pigments in the fat was measured as follows. The reflectance spectrum between 510 and 450 nm was translated to make the reflectance value at 510 nm equal zero (TR). On the translated spectrum, the integral value ($I_{450-510}$) was calculated as follows:

$$I_{450-510}, \text{TR.nm} = [(TR\ 450/2) + TR\ 460 + TR\ 470 + TR\ 480 + TR\ 490 + TR\ 500 + (TR\ 510/2)] \times 10$$

The integral value was averaged over the 3 measurements. The first discrimination method used in the fat (method 1) used $I_{450-510}$ to discriminate P lambs from S lambs.

The reflectance spectrum of perirenal and subcutaneous caudal fat was explored further, by using the whole reflectance data in the zone 400 to 700 nm. This was the second method used in the fat (method 2) to discriminate P lambs from S lambs. The reflectance data at wavelengths between 400 and 700 nm was averaged over the 3 replicates. The mean reflectance data (R) at wavelengths between 400 and 700 nm was transformed ($\log(1/R)$), then exported into the Win ISI II v 1.5 software (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) for multivariate analysis. The raw mean reflectance spectra of each tissue representing the two feeding treatments were submitted to discriminant analysis using the PLS-DA method. Previously, principal component analysis was performed and the mean reflectance spectrum from each feeding treatment was ranked according to the Mahalanobis distance (H) to the average reflectance spectrum in order to detect outliers samples ($H > 3$). No outliers were found. The models were tested by a cross-validation procedure.

2.5. Statistical analysis

The variance of plasma carotenoid concentration and of $I_{450-510}$ was stabilized using logarithmic transformation. Data were subjected to analysis of variance using the GLM procedure of SAS (SAS, 1999) to examine the effect of the feeding treatment.

The proportion of correctly classified lambs was analysed using the CATMOD procedure of the SAS statistical package (SAS, 1999) using a four-factor model (feeding treatment, discrimination method used in the fat, site of measurement and time of measurement) with repeated measures on the three last factors. The animal was considered as the statistical unit.

3. Results

Animal characteristics are given in Tables 3 and 4 for P and S lambs respectively. For P lambs, the duration of the grazing period averaged 143 days (s.e. 28.3), ranging from 94 to 187 days. Slaughtering of P lambs took place from 4 August to 4 November 2004 and from 17 August to 3 November 2005. Carotenoid concentration in concentrate and hay fed to S lambs was 4.3 and 43.6 $\mu\text{g/g DM}$, respectively (Table 5).

3.1. Plasma carotenoid concentration

Plasma carotenoid concentration at slaughter (PCCS) was higher for P than for S lambs ($P < 0.001$). PCCS averaged 75 $\mu\text{g/L}$ (s.e. 2.8) for P lambs, ranging from 27 to 194 $\mu\text{g/L}$, whereas it averaged 10 $\mu\text{g/L}$ (s.e. 0.8) for S lambs, ranging from 0 to 43 $\mu\text{g/L}$. The frequency distribution of PCCS for P and S lambs is reported in Figure 1. The proportion of P lambs with PCCS greater than 27 $\mu\text{g/L}$ was 100%, whereas the proportion of S lambs with PCCS lower than this value was 94.02%. This threshold allowed therefore for the correct classification of 97.01% of the plasma samples.

3.2. Reflectance spectrum

Mean reflectance spectrum of the fat between 400 and 700 nm for P and S lambs is reported in Figures 2 and 3 for measurements made on perirenal and subcutaneous caudal fat respectively.

3.2.1 Reflectance spectrum between 450 and 510 nm (method 1)

3.2.1.1. Perirenal fat

Mean $I_{450-510}$ of perirenal fat at slaughter was significantly different between P and S lambs ($P < 0.001$), averaging -112.31 and -28.81 units for P and S lambs respectively. It ranged from -300.05 to 30.77 units for P lambs and from -156.85 to 54.27 units for S lambs. The frequency distribution of P and S lambs in the different classes of $I_{450-510}$ values measured at slaughter is reported in Figure 4 (a). The proportion of P lambs with a mean $I_{450-510}$ greater than -55 units was 20.28%, whereas the proportion of S lambs with a mean $I_{450-510}$ lower than -55 units was 19.50%. This threshold allowed therefore for the correct classification of 80.11% of the lambs when the measurement was made on perirenal fat at slaughter.

Mean $I_{450-510}$ of perirenal fat measured after 24h shrinkage was significantly different between P and S lambs ($P < 0.001$), averaging -265.32 and -128.65 units for P and S lambs respectively. It ranged from -487.97 to -78.85 units for P lambs and from -283.27 to -8.37 units for S lambs. The frequency distribution of P and S lambs in the different classes of $I_{450-510}$ values measured after 24h shrinkage is reported in Figure 4 (b). The proportion of P lambs with a mean $I_{450-510}$ greater than -200 units was 17.48%, whereas the proportion of S lambs with a mean $I_{450-510}$ lower than -200 units was 5.49%. This threshold allowed

therefore for the correct classification of 88.51% of the lambs when the measurement was made on perirenal fat after 24h shrinkage.

3.2.1.2 Subcutaneous caudal fat

Mean $I_{450-510}$ of subcutaneous caudal fat at slaughter was significantly different between P and S lambs ($P < 0.001$), averaging -111.69 and -69.55 units for P and S lambs respectively. It ranged from -248.15 to -0.43 units for P lambs and from -228.62 to 66.77 units for S lambs. The frequency distribution of P and S lambs in the different classes of $I_{450-510}$ values measured at slaughter is reported in Figure 5 (a). The proportion of P lambs with a mean $I_{450-510}$ greater than -120 units was 57.31%, whereas the proportion of S lambs with a mean $I_{450-510}$ lower than -120 units was 11.59%. This threshold allowed therefore for the correct classification of 65.55% of the lambs when the measurement was made on subcutaneous caudal fat at slaughter.

Mean $I_{450-510}$ of subcutaneous caudal fat after 24h shrinkage was significantly different between P and S lambs ($P < 0.001$), averaging -236.88 and -155.39 units for P and S lambs respectively. It ranged from -381.60 to -51.12 units for P lambs and from -289.23 to -36.47 units for S lambs. The frequency distribution of P and S lambs in the different classes of $I_{450-510}$ values measured after 24h shrinkage is reported in Figure 5 (b). The proportion of P lambs with a mean $I_{450-510}$ greater than -210 units was 32.87%, whereas the proportion of S lambs with a mean $I_{450-510}$ lower than -210 units was 7.32%. This threshold allowed therefore for the correct classification of 79.91% of the lambs when the measurement was made on subcutaneous caudal fat after 24h shrinkage.

3.2.2. Reflectance spectrum between 400 and 700 nm (method 2)

Reflectance method 2 utilised all the optical information for wavelengths between 400 and 700 nm. Method 2 was utilised on both perirenal and subcutaneous caudal fat.

3.2.2.1. Perirenal fat

Method 2 allowed for the correct classification of 79.72% and 95.12% of the P and S lambs respectively (i.e. 87.42% on average) when the measurement was made on perirenal fat at slaughter, and 90.21% and 97.56% (i.e. 93.89% on average) when the measurement was made on perirenal fat after 24h shrinkage.

3.2.2.2. *Subcutaneous caudal fat*

This method correctly classified 94.41% and 91.46% of the P and S lambs respectively (i.e. 92.94% on average) when the measurement was made on subcutaneous fat at slaughter, and 88.11% and 93.90% (i.e. 91.00% on average) when the measurement was made on subcutaneous fat after 24h shrinkage.

3.2.3. *Comparison between both reflectance methods used in the fat*

Performance of method 2, which used all the reflectance spectrum data between 400 to 700 nm was higher ($P < 0.0001$) than that of method 1, which only used the reflectance spectrum data between 450 and 510 nm to calculate $I_{450-510}$: on overall, for both sites, both times of measurements and both feeding treatments, the proportion of correctly classified lambs was actually 78.52% and 91.31% for methods 1 and 2 respectively.

The proportion of correctly classified lambs differed also between feeding treatment (78.06% and 91.77% for P and S lambs respectively, $P < 0.0001$), sites of measurement (87.48% and 82.35% for perirenal and subcutaneous caudal fat, respectively, $P = 0.0001$) and time of measurement (81.51% and 88.33% for measurements made at slaughter and after 24h shrinkage respectively, $P < 0.0001$). There were significant interactions between experimental factors. Figures 6 and 7 show the results obtained using both methods on perirenal and subcutaneous fat for P and S lambs at slaughter and after 24h shrinkage respectively. For P lambs, method 2 increased the proportion of correctly classified lambs compared with method 1 (from 7.7 to 51.7 points), except for measurements made at slaughter on perirenal fat, where both methods gave similar results (79.72%). For S lambs, there were no significant differences between both methods, except for measurements made at slaughter on perirenal fat, where method 2 gave better results (95.12% vs 80.50%; $P < 0.001$). The greatest difference between the methods occurred for the measurement made at slaughter on the subcutaneous caudal fat of P lambs, where the proportion of correctly classified lambs was only 42.69% for method 1, whereas 94.41% for method 2.

4. Discussion

4.1 Plasma carotenoid concentration

This study confirmed that carotenoid pigments can be used successfully to discriminate pasture-fed from stall-fed lambs, although a wide variability in the data was observed. Plasma carotenoid concentration at slaughter allowed for the correct

discrimination of feeding treatments for 97.01% of the plasma samples. Plasma carotenoid concentration ranged from 27 to 194 $\mu\text{g/L}$ for P lambs, which is quite similar to the range observed by Prache et al. (2003; 43 to 280 $\mu\text{g/L}$). Carotenoid intake level probably varies with carotenoid concentration of the herbage, which may have varied widely, since blood samples were collected from the beginning of August to the beginning of November for both years. However, for a given date, a wide variability among animals grazing the same paddock was yet observed. This may have been due to inter-individual variations in grass intake level and in carotenoid absorption and metabolism (Rock, 1997). On heterogeneous swards, it may also be explained by inter-individual variability in dietary choices (Prache & Damasceno, 2006).

4.2. Reflectance spectrum between 450 and 510 nm

4.2.1. Perirenal fat

The discrimination between feeding treatments using perirenal fat $I_{450-510}$ was better when measurements were made after 24h shrinkage (88.51%) than at slaughter (80.11%). This is in disagreement with the results of Priolo et al. (2002), who observed lower discrimination reliability after 24h shrinkage than at slaughter when using the same method. This discrepancy may be due to the fact that we cut a plain surface on the fat before the measurements to ensure a perfect adherence of the eye of the apparatus, whereas this was not done in Priolo et al. (2002).

4.2.2. Subcutaneous caudal fat

The discrimination between feeding treatments using subcutaneous caudal fat $I_{450-510}$ was better when measurements were made after 24h shrinkage (79.91%) than at slaughter (65.55%). These results are in agreement with Priolo et al. (2002), who reported higher discrimination reliability after 24h of shrinkage than at slaughter.

The results from the present study confirm that perirenal fat is more appropriate than subcutaneous caudal fat for discriminating pasture-fed from stall-fed lambs based on the quantification of light absorption by carotenoid pigments in the zone 450 to 510 nm of the reflectance spectrum. The increase in reliability with shrinkage is likely to be due to an increase in carotenoid concentration in the fat because of water evaporation. The quality of the discrimination was however lower in this study than in Priolo et al (2002) using the same method. This may be due to variations across breeds (Limousine in this study whereas

Ile de France in Priolo et al. (2002)). It is also most likely due to the higher variability in the herbage carotenoid content, although it was not measured in either study, and to the higher between-animal variability, considering the large number of animals used in the present study. These results highlight the fact that such validation procedures on large number of animals are essential. Because the tendency to accumulate carotenoids has a genetic component (Sheath & Coulon, 2001), the range of variation of plasma carotenoid concentration and of $I_{450-510}$ in P and S lambs probably varies across breeds. The reliability of the corresponding methods to discriminate P and S lambs in interaction with the breed therefore requires further experimental evaluation.

4.3. Reflectance spectrum between 400 and 700 nm

Differences in the fat composition induce differences in its optical properties, thus in the spectral features of the fat that can be used for diet authentication. Taking into account all the spectral data within the 400-700 nm range improved the reliability of the discrimination method based on the reflectance spectrum of the fat. Analysis of all the optical information between 400 and 700 nm by discriminant analysis showed differences in the fat resulting from the two feeding treatments. This allowed for the correct classification of 87.42% of the perirenal fat samples and 92.94% of the subcutaneous fat samples when measurements were made at slaughter and 93.89% of the perirenal fat samples and 91.00% of the subcutaneous fat samples when measurements were made after 24h shrinkage. The improvement in the discrimination reliability is therefore greater for subcutaneous than for perirenal fat, and for measurements made at slaughter compared to those made after 24h shrinkage. The underlying mechanisms remain an open question. Beyond carotenoid pigments, the visible region is also characteristic for the respiratory pigments. Their absorption bands in the reflectance spectrum of the fat (Soret band at 415-435 nm, absorption bands in the zone 540-580 nm) are linked to haeminic pigments, probably residual haemoglobin after slaughter (Prache, Aurousseau, Th eriez & Rennerre, 1990; Swatland, 1988; Cozzolino, Murray, Scaife & Paterson, 2000). However, the spectral characterization of the fat using visible reflectance spectroscopy to discriminate feeding diets has not been investigated, beyond the work of Prache & Theriez (1999) concerning the absorption zone of carotenoid pigments.

5. Conclusions

This study utilised a large-scale experiment to test the reliability of the plasma carotenoid concentration and the quantity of light absorbed by carotenoid pigments in the fat to allow the discrimination of pasture- from stall-fed lambs. The results confirmed that plasma carotenoid concentration can be used successfully, as it enabled the correct classification 97.01% of the lambs. The proportion of correctly classified lambs using the quantification of light absorbed by carotenoid pigments in the fat ($I_{450-510}$) was greatest for measurements made on perirenal fat after 24h shrinkage (88.51%).

Visible reflectance spectroscopy utilising all the optical information in the 400 to 700 nm range generally improved the reliability of the discrimination based on the reflectance spectrum of the fat. Whatever the site and the time of measurement, the proportion of correctly classified lambs was between 87.42% and 93.89%. This development is of interest because the measurement can be made quickly to keep in pace with processing lines in commercial abattoirs.

However, because the tendency to accumulate carotenoid pigments and/or compounds that affect the optical properties of the fat may have a genetic component, further research is required to investigate these methods with different breeds.

References

- Aurousseau, B., Bauchart, D., Calichon, E., Micol, D., & Priolo, A., (2004). Effect of grass or concentrate feeding systems and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the *M. longissimus thoracis* of lambs. *Meat Science*, 66(3), 531-541.
- Cardinault, N., M. Doreau, C. Poncet, and P. Nozière. (2006). Digestion and absorption of carotenoids in sheep fed fresh red clover. *Animal Science*, 82, 49-55.
- Cozzolino, D., Murray, I., Scaife, J. R., & Paterson, R. (2000). Study of dissected lamb muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy for composition assessment. *Animal Science*, 70, 417-425.
- Daget, P., & Poissonnet, P. (1971). Une méthode d'analyse phytosociologique des prairies. Critères d'application. *Annales agronomiques*, 22(1), 5-41.

- Enser, M., Hallett, K. G., Hewett, B., Fursey, G. A. J., Wood, J. D., & Harrington, G. (1998). Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science*, 49(3), 329-341.
- European Council Directive n° 609 (1986).
- Fisher, A. V., & de Boer, H. (1994). The EAAP standard method of sheep carcass assessment. Carcass measurements and dissection procedures report of the EAAP working group on carcass evaluation, in cooperation with the CIHEAM instituto agronomico Mediterraneo of Zaragoza and the CEC Directorate General for Agriculture in Brussels. *Livestock Production Science*, 38(3), 149-159.
- Karijord, O. (1978). Correlation between the concentration of carotenoids in depot fat and in plasma of sheep. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 28, 355-359.
- Lyan, B., Azais-Braesco, V., Cardinault, N., Tyssandier, V., Borel, P., Alexandre-Gouabau, M. C., & Grolier, P. (2001). Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 751, 297-303.
- Martin, B., Cornu, A., Kondjoyan, N., Ferlay, A., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Rock, E., Chilliard, Y., Coulon, J. B., & Berdagué, J. L. (2005). Milk indicators for recognizing the types of forages eaten by dairy cows. In J. F. Hocquette, & S. Gigli, *Indicators of milk and beef quality*. (pp. 127-136). Proc. European Association of Animal Production Publication, n° 112, Bled, Slovenia.
- Nürnberg, K., Grumbach, S., Zupp, W., Hartung, M., Nürnberg, G., & Ender, K. (2001). Enhancing of n-3 fatty acids and conjugated fatty acid in lamb meat by keeping on pasture. *Fleishwirtschaft*, 81, 120-122.
- Patterson, D. S. P. (1965). The association between depot fat mobilization and the presence of xanthophyll in the plasma of normal sheep. *Journal of Agricultural Science*, 64, 273-278.
- Prache, S., Aurousseau, B., Thériez, M., & Renner, M. (1990). Les défauts de couleur du tissu adipeux sous-cutané des carcasses d'ovins. *INRA Productions Animales*, 3, 275-285.

- Prache S. & Damasceno J. C. (2006). Preferences of sheep grazing down conterminal monocultures of *Lolium perenne-Festuca arundinacea*: Test of an energy intake-rate maximisation hypothesis using the short-term double weighing technique. *Applied Animal Behaviour Science*, 97, 260-220.
- Prache, S., & Theriez, M. (1999). Traceability of lamb production systems: carotenoids in plasma and adipose tissue. *Animal Science*, 69, 29-36.
- Prache, S., Priolo, A., Tournadre, H., Jailler, R., Dubroeuq, H., Micol, D., & Martin, B. (2002). Traceability of grass feeding by quantifying the signature of carotenoid pigments in herbivores meat, milk and cheese. In *Proceedings 19th General Meeting of the European Grassland Federation*, (pp. 592-593), La Rochelle, France, J. L. Durand; J. C. Emile; C. Huyghe & G. Lemaire (eds), AFPF.
- Prache, S., Priolo, A., & Grolier, P. (2003). Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: its significance for the traceability of grass-feeding. *Journal of Animal Science*, 81, 360-367.
- Prache S., Cornu A., Berdagué J. L., & Priolo A., (2005). Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research*, 59(2-3), 157-168.
- Priolo, A., Prache, S., Micol, D., & Agabriel, J. (2002). Reflectance spectrum to trace grass feeding in sheep: Influence of measurement site and shrinkage time after slaughter. *Journal of Animal Science*, 80, 886-891.
- Rock, C. L. (1997). Carotenoids: biology and treatment. *Pharmacology and Therapeutics*. 75(3), 185-197.
- Russel A. J. F., Doney, J. M., & Gunn, R. G. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal Agricultural Science*, 72, 451-454.
- SAS (1999). *SAS/STAT User's Guide*, Version 8. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Sheath G. W., Coulon J. B., & Young O. A., (2001). Grassland management and animal product quality. In: Gomide, J.A., Mattos, W.R.S., de Silva, S.C. (Eds), *Proceedings of the 19th International Grassland Congress on Grassland Ecosystems: An Outlook into the 21st Century*. (pp. 1019-1026). Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.

Swatland, H. J. (1989). Carotene reflectance and the yellowness of bovine adipose tissue measured with a portable fibre-optic spectrophotometer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46(2), 195-200.

Figure 1. Frequency distribution of plasma carotenoid concentration at slaughter in pasture- and stall-fed lambs.

Figure 2. Mean reflectance spectrum between 400 and 700 nm of perirenal fat at slaughter (a) and after 24h shrinkage (b). Pasture-fed lambs (—) v. stall-fed lambs (---).

Figure 3. Mean reflectance spectrum between 400 and 700 nm of subcutaneous caudal fat at slaughter (a) and after 24h shrinkage (b). Pasture-fed lambs (—) v. stall-fed lambs (---).

Figure 4. Distribution of the pasture- and stall-fed lambs in the different classes of the integral value of the translated spectrum between 450 and 510 nm ($I_{450-510}$). Measurement made on perirenal fat at slaughter (a) and after 24h shrinkage (b).

Figure 5. Distribution of the pasture- and stall-fed lambs in the different classes of the integral value of the translated spectrum between 450 and 510 nm ($I_{450-510}$). Measurement made on subcutaneous caudal fat at slaughter (a) and after 24h shrinkage (b).

Figure 6. Proportion of correctly classified lambs using method 1 (integral value $I_{450-510}$) and method 2 (whole reflectance spectrum data in the zone 400 to 700 nm) on perirenal and subcutaneous caudal fat at slaughter. Open and solid symbols refer to methods 1 and 2 respectively. Perirenal Pasture, Caudal Pasture, Perirenal Stall and Caudal Stall refer to measurement made on perirenal fat for pasture-fed lambs, on subcutaneous caudal fat for pasture-fed lambs, on perirenal fat for stall-fed lambs and on subcutaneous caudal fat for stall-fed lambs respectively. *** Proportion was significantly different at $P < 0.001$ between both methods.

Figure 7. Proportion of correctly classified lambs using method 1 (integral value $I_{450-510}$) and method 2 (whole reflectance spectrum data in the zone 400 to 700 nm) on perirenal and subcutaneous caudal fat after 24h shrinkage. Open and solid symbols refer to methods 1 and 2 respectively. Perirenal Pasture, Caudal Pasture, Perirenal Stall and Caudal Stall refer to measurement made on perirenal fat for pasture-fed lambs, on subcutaneous caudal fat for pasture-fed lambs, on perirenal fat for stall-fed lambs and on subcutaneous caudal fat for stall-fed lambs respectively. **, *** Proportion was significantly different at $P < 0.01$ and $P < 0.001$ between both methods.

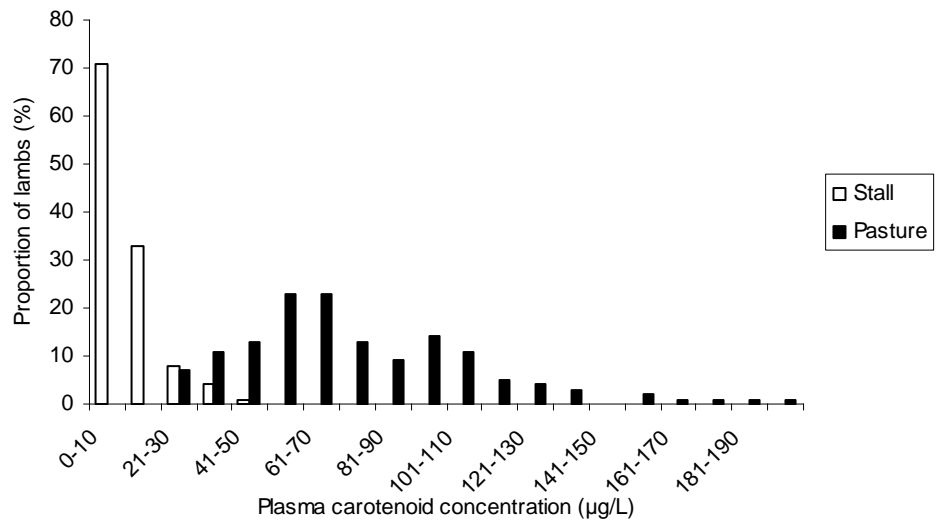
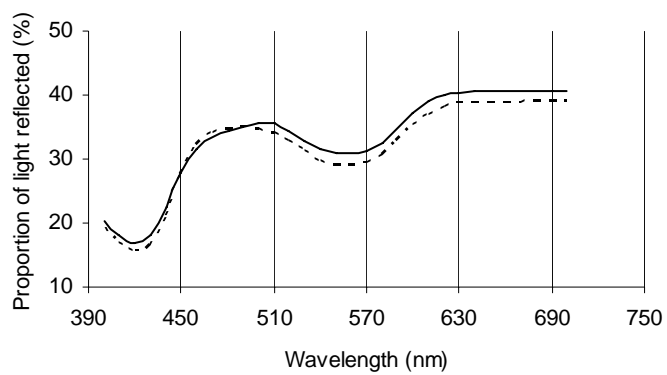


Figure 1.

(a)



(b)

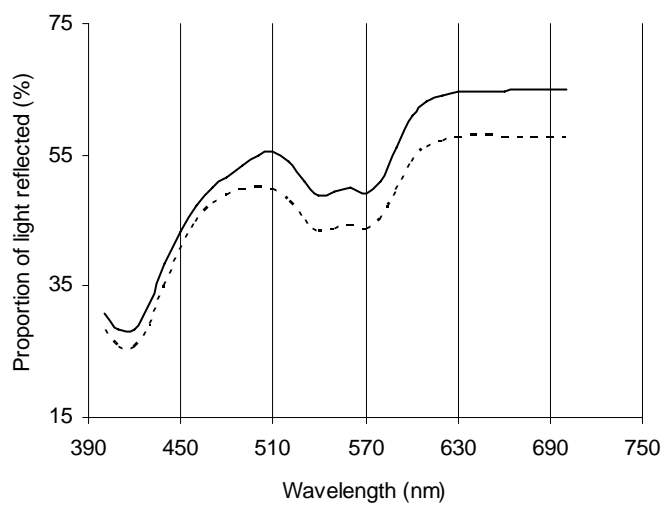
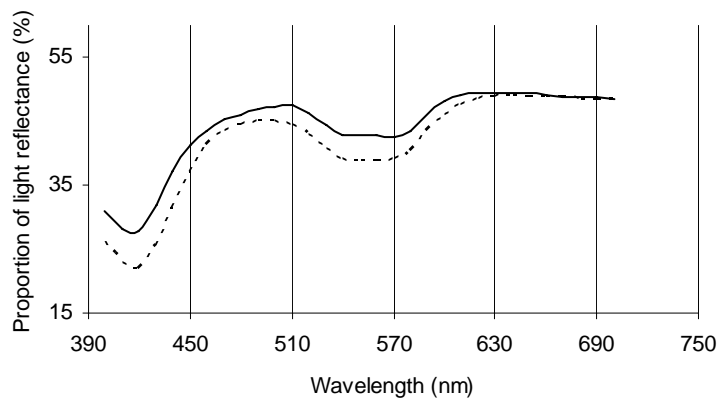


Figure 2.

(a)



(b)

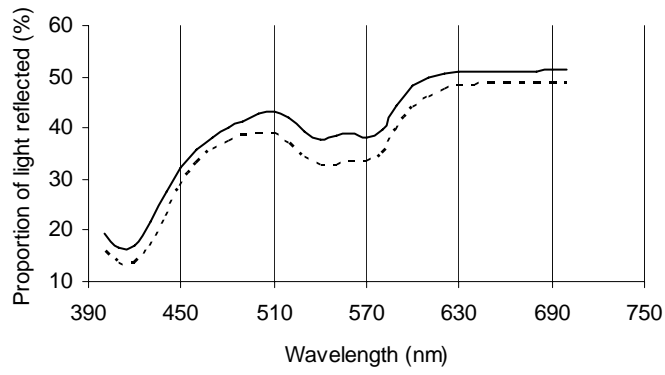
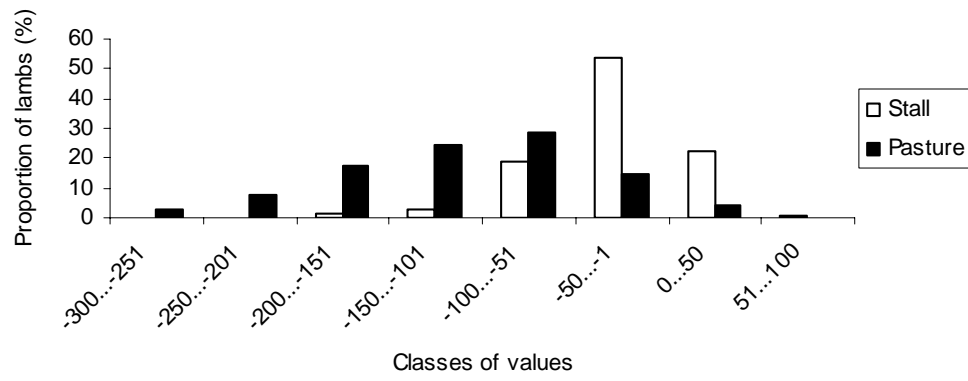


Figure 3.

(a)



(b)

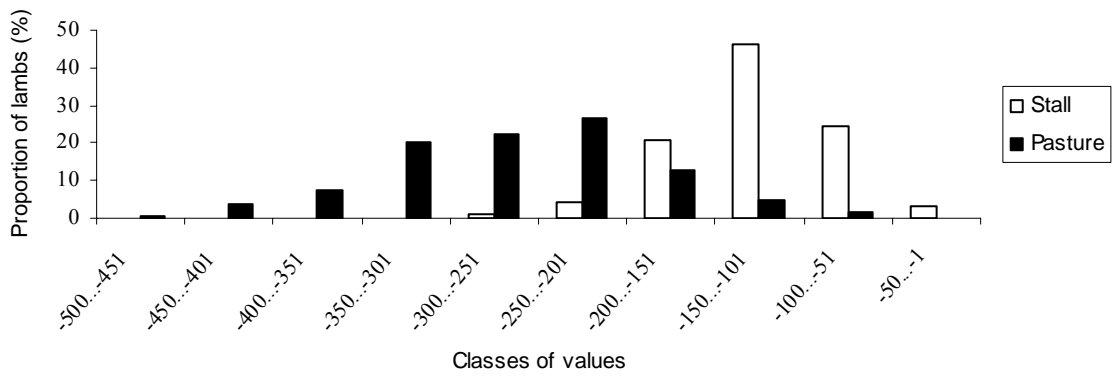
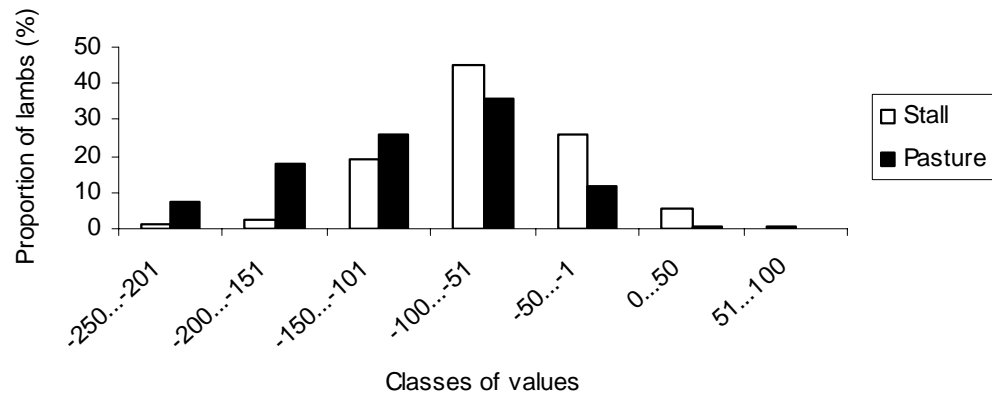


Figure 4.

(a)



(b)

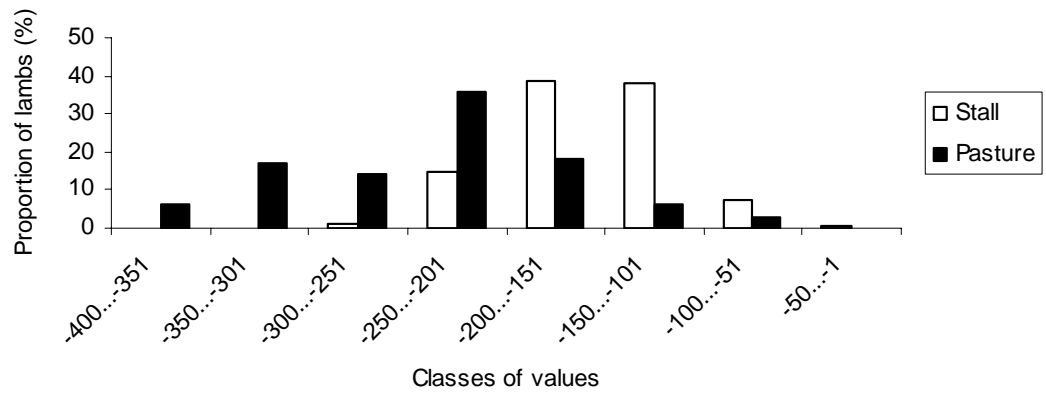


Figure 5.

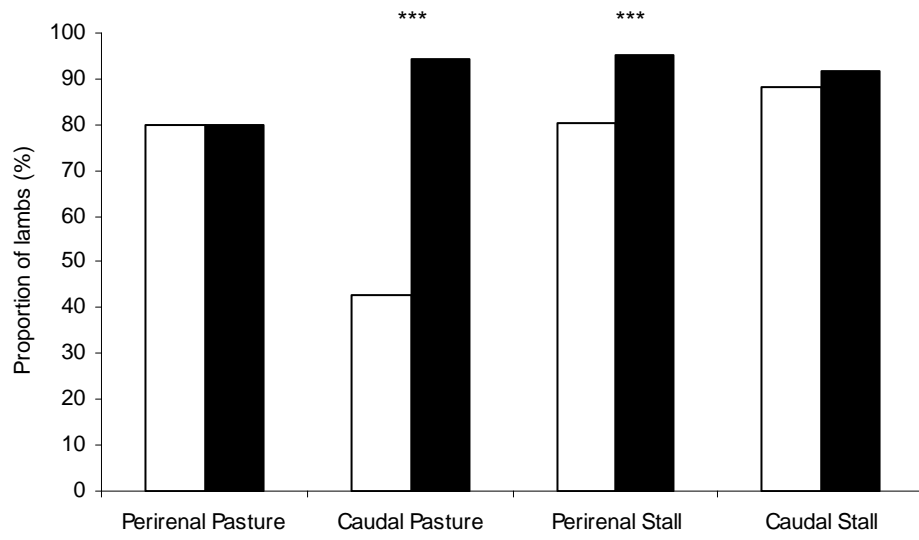


Figure 6.

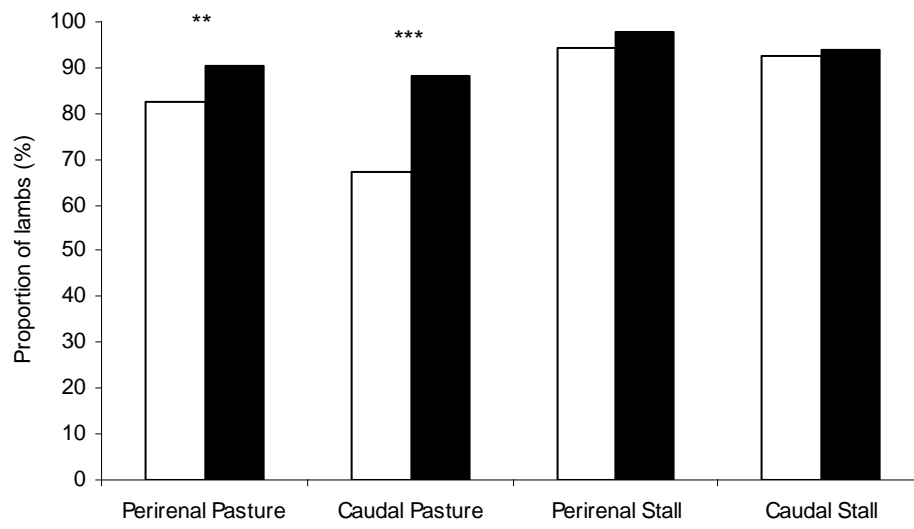


Figure 7.

Table 1- Botanical composition of the pasture grazed by pasture-fed lambs (%)

<i>Taraxacum</i> sp.	37.9
<i>Trifolium repens</i>	29.0
<i>Dactylis glomerata</i>	8.3
<i>Bromus hordeaceus</i> ssp. <i>Hordeaceus</i>	6.0
<i>Lolium perenne</i>	4.9
<i>Elymus repens</i>	3.9
<i>Poa trivialis</i>	1.8
<i>Agrostis capillaries</i>	1.2
<i>Rumex crispus</i>	1.0
<i>Poa pratensis</i>	0.8
<i>Ranunculus acris</i>	0.8
<i>Veronica chamaedrys</i>	0.8
<i>Rumex obtusifolius</i>	0.8
<i>Cerastium fontanum</i> ssp. <i>Triviale</i>	0.7
<i>Heracleaum sphondylium</i>	0.7
<i>Holcus lanatus</i>	0.4
<i>Holcus mollis</i>	0.2
<i>Cruciata laevipes</i>	0.2
<i>Rumex acetosa</i>	0.2
<i>Alopecurus pratensis</i>	0.2
<i>Trifolium pratense</i>	0.1
<i>Trisetum flavescens</i>	0.1

Table 2- Composition of the concentrate dispensed to stall-fed lambs (g/kg)

Components	
Barley	350.5
Soybean meal	141.0
Dried sugar beet pulp	110.0
Wheat	100.0
Sunflower meal	79.0
Wheat red shorts	81.0
Maize	60.0
Sugar cane molasses	27.0
Calcium carbonate	17.0
Lignin	10.0
Minerals ¹ and vitamins ²	8.0
Rape oil	7.0
Ammonium Chloride	5.0
Salt	4.0
Aroma	0.5

¹ 14 g/kg of Ca, 4.5 g/kg of P, 150 mg/kg of Zn, 108 mg/kg of Fe, 50 mg/kg of Mn, 2 mg/kg of Co, 6.5 mg/kg of I, 0.182 mg/kg of Se.

² 6,000 UI/kg of vitamin A, 1,200 UI/kg of vitamin D3, 20 UI/kg of vitamin E.

Table 3. Mean characteristics (standard deviation) of the pasture-fed lambs

Variable	
Number	143
Birthweight (kg)	4.04 (0.667)
Liveweight at slaughter (kg)	33.2 (2.89)
Age at slaughter (d)	165 (28.1)
Average daily gain from birth to slaughter (g/d)	180 (40.0)
Cold carcass weight (kg)	14.34 (1.608)
Perirenal fat weight (g)	264 (105.8)
Dorsal fat thickness (mm)	2.5 (0.84)

Table 4. Mean characteristics (standard deviation) of the stall-fed lambs

Variable	
Number	164
Birthweight (kg)	3.73 (0.753)
Liveweight at slaughter (kg)	33.7 (3.62)
Age at slaughter (d)	111 (17.6)
Average daily gain from birth to slaughter (g/d)	276 (48.9)
Cold carcass weight (kg)	15.83 (1.835)
Perirenal fat weight (g)	296 (145.0)
Dorsal fat thickness (mm)	3.5 (0.96)

Table 5. Carotenoid concentration ($\mu\text{g/g DM}$) of the feed offered to stall-fed lambs

	Lutein	Beta-carotene	Zeaxanthin	Epilutein	Total carotenoids
Concentrate	4.3	0.0	0.0	0.0	4.3
Hay	33.7	0.0	7.2	2.8	43.6