



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

VITAMINA C Y β -CAROTENO COMO ANTIOXIDANTES EN DIETAS
PARA LECHONES RECIEN DESTETADOS

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

DEMIÁN MAURICIO FERNÁNDEZ DUEÑAS

TUTOR:
DR. JOSÉ ANTONIO CUARÓN IBARGÜENGOYTIA

COMITÉ TUTORAL
DR. GERMÁN BORBOLLA SOSA
DR. JOSÉ ANTONIO CUARÓN IBARGÜENGOYTIA
DR. GERARDO MARISCAL LANDÍN

AJUCHITLÁN, COLÓN, QUERÉTARO

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Devisón H. Fernández

Davisón

FECHA: 19/02/05

FIRMA: [Signature]

Dedicatoria

A mis padres, Hugo y Paty, como una muestra de agradecimiento, ya que sin su amor, ejemplo, apoyo, comprensión, y dedicación cada una de nuestras metas, no tendrían el mismo valor.

A mis hermanos, Adrián y Aline, por brindarme su sincero apoyo e incondicional amistad a cada paso, gracias por ser quienes son.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrir espacios a la educación, e investigación y ofrecer a sus egresados una formación íntegra.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, por el apoyo en la realización del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el fomento a la educación e investigación del país.

Al Dr. Cuarón, sus enseñanzas y consejos son invaluable para la formación de mejores profesionistas y seres humanos.

Al Dr. Mariscal, Dr. Borbolla, Dr. Mejía, Dr. Rentería, Dr. Castrejón, por su orientación para la culminación de este trabajo.

A Erica y Mariela, por su soporte y conocimiento en laboratorio, ya que sus consejos fueron importantes para la realización de esta investigación.

A PAIEPEME, A.C. por la asistencia ofrecida durante la Maestría.

A Schillacci, Mono, Roldán, Ramón, Vilchis y Fava, gracias por seguir estando ahí, siempre cerca.

A Arlette, gracias por estar cerca en los momentos necesarios.

A Noe, Gisela, Jaime, Juan, Mario, Dímas, Víctor, Betty, Mauricio, Jesús, Marina, Gregorio, por compartir este momento, este espacio, ya que sin duda su amistad y su presencia en todo momento fue fundamental a lo largo de este camino.

Índice

1. Introducción	1
2. Revisión de Literatura	
2.1. Oxidación	3
2.2. Potencial de oxidación en la dieta	6
2.3. Antioxidantes	7
2.3.1. Preventivos	
2.3.1.1. Enzimas	8
2.3.1.2. Selenio	9
2.3.2. Vitaminas	
2.3.2.1. Vitamina E	10
2.3.2.2. Vitamina C	11
2.3.2.3. Vitamina A	12
2.3.3. Pro-vitaminas	
2.3.3.1. β -Caroteno	14
2.3.4. Interacciones entre antioxidantes	16
3. Conclusiones	18
4. Justificación	19
5. Hipótesis	19
6. Objetivos	19
7. Vitamin C and β -Carotene as antioxidants in diets for pigs at Weaning	20
7.1. Abstract	21
7.2. Abbreviations	23
7.3. Introduction	25
7.4. Materials and Methods	
7.4.1. Experiment 1	27
7.4.2. Experiment 2	30
7.5. Results	31

7.6. Discussion	33
7.6.1. Growth Performance	36
7.6.2. Enzyme Activity	38
7.6.3. Lipid Peroxidation	40
7.7. Conclusions	41
7.8. Tables	48
7.9. References	56
8. Discusión	59
8.1. Comportamiento productivo	61
8.2. Actividad Enzimática	63
8.3. Peroxidación Lipídica	
9. Literatura Citada	

Índice de Cuadros

1. Composición de Dietas Experimentales y análisis nutricional (Exp. 1 y 2).	41
2. Concentración de vitamina C y β -Caroteno en dietas Experimentales.	44
3. Efectos de vitamina C y β -Caroteno en el comportamiento Productivo, Actividad de GSH Px y Producción de TBARS (Exp.1).	45
4. Efectos de vitamina C y β -Caroteno en el Comportamiento Productivo (Exp.2).	47

Resumen

Se realizaron dos experimentos para evaluar la actividad de la vitamina C y β -Caroteno en el comportamiento productivo, así como su actividad antioxidante, cuando estos fueron incluidos en la dieta de lechones destetados a 21 días de edad.

El Experimento 1 (Exp.1) tuvo una duración de 24 días y se usaron un total de 220 animales destetados a 22.1 ± 1.7 días de edad y 5.5 ± 1.2 kg de peso, en un diseño experimental de Bloques completos al azar en un arreglo factorial de 2 niveles de vitamina C \times 2 niveles de β -caroteno, con 11 repeticiones por tratamiento y 5 lechones por corral, bajo condiciones de granja comercial en donde el comportamiento productivo de los animales fue desafiado por la intensidad del flujo de producción así como por el estatus sanitario de la granja (*Mycoplasma spp.*, *Streptococcus suis*, PRRS). La fuente de energía suplementaria usada para el Exp.1, fue aceite de canola, el cual estuvo almacenado previo a la fabricación del alimento en condiciones de sala de destete (27 a 32° C y humedad relativa de 80 a 100%) para favorecer la oxidación del aceite. Se obtuvieron muestras de sangre para determinar la presencia de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) y la actividad de la enzima Glutathion Peroxidasa (GSH-Px) como indicadores de la acción antioxidante de vitamina C y β -caroteno.

El Experimento 2 (Exp.2) contó con un total de 64 lechones destetados de 20.2 ± 0.9 días de edad y un peso de 5.8 ± 1.1 kg, en un diseño experimental completamente al azar, con el mismo arreglo factorial descrito para el Exp.1 con 4 repeticiones por tratamiento y 4 lechones por corral. El Exp.2 tuvo una duración de 20 días y se realizó en condiciones de granja experimental, sin la adición de antibióticos a la dieta pre-iniciadora y con el uso de sebo como fuente de energía suplementaria, el cual fue almacenado bajo las mismas condiciones que el aceite de canola para el Exp.1. Las dietas experimentales usadas en ambos experimentos fueron: 1) Dieta Control: vitamina C, $0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ y β -caroteno, $0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

¹ de la dieta (CON); 2) vitamina C, 150 mg·kg⁻¹ y β-caroteno, 0 mg·kg⁻¹ (VC); 3) vitamina C, 0 mg·kg⁻¹ y β-caroteno, 350 mg·kg⁻¹ (βC) y 4) vitamina C, 150 mg·kg⁻¹ y β-caroteno, 350 mg·kg⁻¹ de la dieta (VCβC). Se tomaron muestras de aceite de canola, sebo y alimento terminado para determinar los niveles de peróxidos. La concentración de vitamina C y β-caroteno fue determinada en las dietas experimentales.

El comportamiento productivo no fue diferente ($P>0.20$) entre tratamientos; en consumo diario de alimento (CDA; 0.404, 0.379, 0.393 y 0.409 kg para CON, VC, βC y VCβC, respectivamente), ganancia diaria de peso (GDP; 0.303, 0.280, 0.303 y 0.306 kg) y eficiencia alimenticia (EA; 0.755, 0.745, 0.769 y 0.746, para cada uno de los tratamientos) al término del experimento (24 días). No existieron diferencias para la actividad de la GSH Px ($P<0.20$) y la producción de TBARS ($P<0.18$) en plasma. En el Exp.2 los lechones alimentados con la dieta VCβC (tratamiento 4) mostraron un incremento del ($P<0.03$) 12% en CDA comparado con los tratamientos 2 y 3 (VC y βC; 0.292, 0.251, 0.259 y 0.287 kg). No se observaron efectos en GDP y EA.

La ausencia de respuesta a los tratamientos podría explicarse por la presencia de otros nutrientes con propiedades antioxidantes en la dieta, tales como la vitamina E y el Selenio (Se). Así mismo, los antioxidantes sintéticos en la premezcla vitamínica y mineral podrían enmascarar los posibles efectos de la vitamina C y β-caroteno evitando la producción de TBARS, y por lo tanto sin efectos positivos en los sistemas de prevención de estrés oxidativo, como la GSH Px, que no respondió favorablemente a la presencia de vitamina C y β-caroteno. Lo anterior podría explicar la falta de beneficios en el comportamiento productivo con la suplementación de dichos compuestos en la dieta.

1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas convencionales de producción de cerdos generan situaciones que pueden ir en detrimento del comportamiento productivo de los lechones. En el cerdo, el destete, antes de los 28 días de vida, es un factor de estrés porque el aparato digestivo de los lechones aún debe desarrollarse para responder a un alimento de características diferentes a las de la leche materna, y que además cubra las demandas de un período de crecimiento más dinámico, lo que resulta en grandes demandas metabólicas (Reis de Souza y Mariscal, 1997; Morgan *et al.* 1999). También es en este período, cuando el lechón sufre presiones de índole inmunológico (al disminuir las defensas de origen materno y estimularse la inmunidad activa propia de la población) y social (como la organización jerárquica) las cuales pueden verse reflejadas en el consumo voluntario de alimento y por lo tanto en ganancia de peso y eficiencia alimenticia, determinantes en el porvenir de su vida productiva (Dibner *et al.* 1996; Reis de Souza y Mariscal, 1997; De Rouchey *et al.* 2004).

El estrés al que los lechones son sometidos puede provocar, entre otras cosas, el aumento en la secreción de hormonas tales como la adrenalina, corticoesteroides así como la disminución de factores del crecimiento, lo cual no solo detiene la deposición de proteína, también favorece el catabolismo de lípidos y proteínas, preparando a los lechones a enfrentar situaciones de adaptación o agresión, como el destete (Reis de Souza y Mariscal, 1997; Morgan *et al.* 1999). También existe el estrés oxidativo, que se define como el desequilibrio entre radicales libres y los agentes encargados de neutralizarlos, conocidos como antioxidantes. (Lauridsen *et al.* 1999; Dröge, 2002). Estos afectan principalmente a lípidos y proteínas a nivel de membrana celular, modificando la molécula por la formación de hidroperóxidos, ocasionando la inactivación de enzimas y la alteración de aminoácidos entre otros, originando así la degradación de estas moléculas, lo que provoca malonaldehídos y ácidos grasos volátiles. Así mismo, hay proteólisis,

perdiéndose la integridad de la membrana e incrementando su permeabilidad iónica (Halliwell, 1987; Aurousseau, 2002; Dröge, 2002).

La principal fuente de agentes oxidantes es la dieta y, en ella destacan las fuentes de energía empleadas, principalmente aquellas con altos contenidos en ácidos grasos polinsaturados (PUFA), altamente susceptibles a oxidarse y que se convierten en iniciadores y propagadores de este evento en el animal (Dibner *et al.* 1996).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. OXIDACIÓN

La oxidación es una serie de eventos no reversibles, que sucede en cuatro pasos fundamentales (Wander, 2001; Aurousseau, 2002):

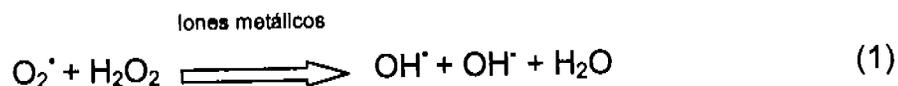
- a. Iniciación, cuando hay un desequilibrio entre compuestos prooxidantes y antioxidantes;
- b. Propagación cuando un radical libre remueve un átomo de hidrógeno de sustratos oxidables, tales como proteínas, lípidos y carbohidratos en células;
- c. Amplificación, cuando un radical libre unido a cualquier molécula, genera dos radicales orgánicos capaces de continuar con la reacción;
- d. Interrupción, sea por agentes antioxidantes dispuestos en los tejidos, o bien por eventos metabólicos que conducen a una liberación, a veces momentánea, del oxígeno reactivo.

El estrés oxidativo se define entonces, como el desequilibrio entre radicales libres y agentes antioxidantes, a favor de los primeros, haciendo imposible una rápida metabolización o eliminación de estos. Los radicales libres, se definen como moléculas con un electrón no acoplado, capaz de oxidar (radical hidroxilo = OH^\bullet) o reducir (radical superóxido = O_2^\bullet) otras moléculas (Lauridsen, 1999; Dröge, 2002).

Los metabolitos reactivos al oxígeno, son fundamentales, como mecanismo de defensa en las células fagocíticas durante la eliminación de las bacterias. Sin embargo, cuando se pierde la homeostasis en este sistema, no solo se favorece la oxidación de membranas, también hay una competencia por estos radicales libres por parte de agentes reductores, lo cual crea presión en ciertas rutas metabólicas

(Aurousseau, 2002). Este es el caso del ciclo de las pentosas (tejido hepático, adiposo, glándula mamaria y eritrocitos), que es responsable de la generación de NADPH, molécula indispensable para la síntesis de ácidos grasos, nucleótidos y glutatlon reducida, ésta última fundamental en la protección contra radicales libres. Este ciclo es más activo cuando la glucólisis se ve disminuida, y cuando la concentración de ATP se incrementa. Cuando las fuentes de glucosa en el animal son llimitadas y adicionalmente existen situaciones de estrés oxidativo, el estado metabólico se complica (Burton, 1989; Miller, 1993; Salway, 1999).

Los radicales libres con propiedades oxidantes, tienen alta afinidad por los hidrógenos, formando agua a partir del OH^{\bullet} y originando otras especies de radicales libres; cuando actúan sobre los ácidos grasos de las membranas se inicia el daño celular, causado por la peroxidación lipídica. Cuando los radicales libres son altamente reactivos, sus biomoléculas blanco están en el entorno en que fueron producidos, por el contrario cuando la reactividad de ellos es baja, pueden difundirse más rápidamente, y el daño producido puede ser en sitios diferentes al de su origen (Slater *et al.*, 1987; Halliwell, 1987). Este evento participa activamente como un mecanismo de defensa: el O_2^{\bullet} generado, comúnmente al nivel de la mitocondria, cuando los electrones se unen al O_2 en lugar de acoplarse al Citocromo C Oxidasa, participa activamente en la eliminación de patógenos fagocitados por los neutrófilos. Para llevar a cabo esta función, el NADPH del citosol del neutrófilo es oxidado a NADP^+ , cediendo sus electrones al O_2 para transformarlo en O_2^{\bullet} al exterior de la célula; entonces, se forma la vesícula fagocítica, que se fusiona con las vacuolas de actividad proteolítica, induciendo la muerte bacteriana (Halliwell, 1987). Sin embargo, el radical libre de más trascendencia originado a partir del O_2^{\bullet} y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es el OH^{\bullet} (reacción 1), el cual requiere de algunos iones metálicos, como el Hierro (Fe), del Azufre (S) y algunos aminoácidos (cisteína; Willson, 1987), como catalizadores en la formación del radical (Halliwell, 1987).



Entre los iones metálicos de mayor importancia en el desarrollo de estados de estrés oxidativo, está el Fe, el cual se encuentra regularmente unido a proteínas de transporte (Transferrina) o proteínas de almacenamiento (Ferritina). Sin embargo, existe una mínima cantidad de este elemento en forma libre dentro de la célula, siendo ésta la forma más susceptible de promover la formación del OH[·]. Cuando los tejidos se ven afectados, por un proceso infeccioso o traumático, las reservas de Fe³⁺ o la forma libre del elemento es movillizado al lugar, favoreciendo así la peroxidación lipídica (Halliwell, 1987; Willson, 1987).

La peroxidación lipídica, es la interacción negativa de los radicales libres con la fracción lipídica de la membrana celular, y la propagación al resto de estos elementos en los tejidos (Wander, 2001). Esta peroxidación, causa entre otros daños, la pérdida de la fluidez de los elementos (asociación entre lípidos y proteínas) de la membrana, el incremento en la permeabilidad no selectiva de iones a nivel de membrana celular, favorece la inhibición o estímulo de enzimas específicas asociadas a membrana y la generación de subproductos de la peroxidación que actúan como radicales libres, los cuales se distribuyen en el organismo propagando la oxidación (Slater, 1987; Halliwell, 1987, North *et al.* 1994). Estos subproductos son conocidos como Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), siendo el más importante el Malonaldehído (MDA), con una alta afinidad por los PUFA (Jackson, 1987).

El MDA es uno de los subproductos de la peroxidación lipídica más importantes en los ácidos grasos, principalmente en aquellos con más de tres dobles ligaduras. La sustracción de un átomo de H se da en una posición entre dos dobles ligaduras, en la cadena del ácido graso y posteriormente, con la presencia de O₂, pueden llegar a formarse radicales libres cíclicos, que llegan a la oxidación de otro

ácido graso. Al sustraer un átomo de H, se forman peróxidos cíclicos, que al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico producen MDA (Raharjo y Sofos, 1993; Wander, 2001).

2.2. POTENCIAL DE OXIDACIÓN EN LA DIETA

La oxidación es un proceso que puede afectar todos los componentes, entre los más susceptibles está la fracción lipídica. La vitamina E y el Se, este último como cofactor de la enzima Glutation Peroxidasa (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9), son los principales nutrientes participantes en procesos para la eliminación de dichos radicales libres por lo que son elementos de importancia en la nutrición de los animales (Lawrence y Burk, 1976; Aurousseau, 2002).

El uso de fuentes energéticas ricas en ácidos grasos poli-insaturados, como muchos de los aceites de origen vegetal (NRC, 1998) tienen efectos benéficos en el sistema inmune de los animales generando eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), formados a partir del ácido araquidónico (C20:4) (Mayes, 1996; Wander *et al.* 1997). En cerdos de crecimiento y finalización, el comportamiento productivo ha demostrado una respuesta lineal positiva a la inclusión de aceite de canola (Myer *et al.* 1992). La síntesis de ciertos ácidos grasos, tales como el ácido linoléico es de gran importancia, pues estos participan en el correcto funcionamiento de los linfocitos, así como determinan la composición y concentración de lipoproteínas específicas a ciertos receptores en plasma. Aun cuando el efecto de estos ácidos grasos en el sistema inmune dependerá en gran medida de la cantidad, calidad y tiempo de consumo de la fuente energética incluida en el alimento (Maki y Newberne, 1992), la manipulación del perfil de ácidos grasos en la dieta, favoreciendo la presencia de PUFA (ácido linoléico: 18:2, linolénico: 18:3, eicosatrienónico: 20:3, araquidónico: 20:4, eicosapentaenónico: 20:5 y docosahexanónico: 22:6), ocasiona que el perfil de ácidos grasos a nivel de la fracción lipídica de la membrana celular (en

triglicéridos, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina) tiende a ser parecido al del ofrecido en el medio (Raharjo y Sofos, 1993). Esta característica, facilita el ataque de los radicales libres a los PUFA y colabora en la oxidación de los mismos, principalmente en los ácidos grasos con más de 20 carbonos en su cadena (20:3, 20:4, 20:5 y 22:6; North *et al.* 1994).

Cuando los PUFA se encuentran en proceso de oxidación, pueden provocar daños a nivel tisular y funcional, (mayor proliferación celular, deficiencias en la absorción de nutrientes y disminución a la resistencia de agentes patógenos) lo cual se ve reflejado en el comportamiento productivo de los animales (Willson, 1987; Dibner, *et al.* 1996; Wander *et al.*, 1997). Una mayor proporción de PUFA en la dieta y la modificación del perfil de ácidos grasos en los tejidos (disminución en los saturados y aumento en los insaturados), así como la presencia de metales de transición (cobre o hierro), no solo favorece un evento de oxidación de la fracción lipídica de membranas celulares, también incrementa los requerimientos de antioxidantes en la dieta, como los tocoferoles y/o potencializa la interacción entre agentes antioxidantes principalmente vitamina E y vitamina C (Schaefer *et al.* 1995; Soler- Velásquez, 1998; Lauridsen *et al.* 1999).

2.3. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes se definen como agentes capaces de eliminar los radicales libres o subproductos de la oxidación, o detener esta una vez que se ha iniciado (Aurousseau, 2002).

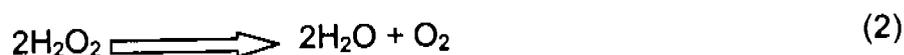
Estos pueden ser de dos tipos, preventivos o aquellos que interrumpen la cadena de la oxidación. Dentro de los agentes preventivos se encuentran algunas enzimas y minerales traza; mientras que entre los agentes que detienen el proceso de oxidación se encuentran algunas vitaminas y pro-vitaminas (Slater *et al.* 1987).

2.3.1. Preventivos

2.3.1.1. Enzimas

Entre los antioxidantes preventivos, están algunas enzimas tales como la Superóxido Dismutasa (SOD), cuyo sustrato único es el ion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) convirtiéndolo en H_2O_2 . Esta enzima cuenta con Zinc (Zn) en su molécula (elemento que se encuentra en gran cantidad de enzimas y que protege los sitios de azufre, evitando la afinidad de los radicales libres por estos sitios) o con cobre (Cu, Willson, 1987).

Este a su vez es convertido en 2 moléculas de agua por acción de la Catalasa como se expresa en la reacción (2):



Por otro lado, la GSH-Px remueve el H_2O_2 a partir de Glutation reducido (GSH) a Glutation oxidado (GSSG), descrito en la reacción 3. La molécula de GSH, puede ser regenerada a partir de la molécula de GSSG y NADPH, como se muestra en la reacción 4, catalizada por la enzima Glutation reductasa :



De este sistema enzimático la SOD y la GSH Px tienen una distribución intracelular importante (citosol y mitocondria), siendo menor su distribución en el fluido extracelular, principalmente de la SOD; mientras que la catalasa esta localizada en peroxisomas (Haliwell, 1987). La GSH Px, no solo remueve peróxidos generados por el metabolismo, sino también aquellos cuyo origen está

en la dieta. Esta enzima se encuentra en cuatro formas principales: 1) la que se localiza en el citoplasma; 2) en tracto gastrointestinal; 3) en plasma, secretada en riñón e hígado anulando tanto peróxidos en fosfolípidos, como en forma libre; y 4) localizada adyacente a membranas celulares (Mahan, 2001).

2.3.1.2. Selenio

La función de la enzima está altamente relacionada con la presencia de selenio en la dieta, ya que este elemento es el centro activo de la enzima. El sitio de absorción del selenio está determinado por la fuente usada en el alimento (Mahan, 2001), sin embargo su incorporación a la enzima GSH Px, no dependerá de la fuente de Se, sino responderá a la presencia del elemento en el organismo, así como del estatus oxidativo. Cuando el Se circulante se ve disminuido por las demandas del organismo en cerdas gestantes (a diferencia de la vitamina E, el Se atraviesa la barrera placentaria eficientemente, Mahan y Kim, 1996) y lactantes, la actividad de la GSH Px, también se ve reducida, probablemente por el uso de este mineral en el metabolismo de la hembra, así como por el aumento de la secreción del elemento en la leche (hasta tres veces más), lo cual representa la principal fuente de Se para los lechones (Mahan y Kim, 1996; Mahan, 2000). Contrariamente, en los lechones, la actividad de la enzima durante la lactancia se mantiene constante con o sin suplementación e independiente de la fuente del Se, aumentando con la edad de los animales. La retención en tejidos, puede afectarse de acuerdo al origen del elemento en la dieta por ejemplo el Se orgánico unido a aminoácidos (selenometionina), se incorpora más fácilmente a los tejidos como músculo e hígado (Mahan y Parret, 1996; Mahan *et al.* 1999).

2.3.2. Vitaminas

2.3.2.1. Vitamina E

La vitamina E (α -tocoferol) es conocida como el antioxidante natural más importante en la anulación de los radicales libres en las fracciones lipídicas, tanto en condiciones normales, como en situaciones extremas o de estrés (Jackson, 1987). Esta vitamina compite por los sustratos susceptibles de oxidación con los radicales peroxilos; el metabolito formado de esta reacción es estable y poco reactivo con los componentes de los tejidos y es eliminado por la reacción con otro radical libre o regenerado por el ácido ascórbico (Burton, 1989).

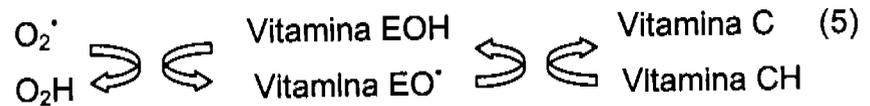
Los niveles de los tocoferoles en el organismo se ven afectados, entre otras cosas, por el tipo de grasa en la dieta y el perfil de los ácidos grasos en tejidos (Soler-Velásquez *et al*, 1998). La vitamina E es hidrolizada por la bilis, la lipasa y estererasas pancreáticas, posteriormente el α -tocoferol, se asocia a micelas siendo absorbido por los enterocitos e incorporado a quilomicrones para ser transportado por la linfa hasta llegar al hígado (Ching *et al.*, 2002; Moreira y Mahan, 2002), una vez ahí, el α -tocoferol es incorporado a lipoproteínas de muy baja (VLDL) y baja densidad (LDL). La fuente más importante de vitamina E para los lechones es el calostro y posteriormente la leche materna, (ya que la tasa de paso de la vitamina a través de la placenta es baja). La concentración de la vitamina en leche disminuye conforme la lactancia avanza; mientras que la concentración de esta vitamina en los tejidos de los lechones, (particularmente el hígado, principal órgano de almacén de la vitamina E) será mayor al momento del destete, comparado con la concentración al momento del nacimiento (Mahan y Vallet, 1997).

La concentración de α -tocoferol en el suero de los lechones al destete dependerá de la fuente y de los niveles de la vitamina en el alimento de la cerda

lactante (Mahan *et al.* 2000), así como la presencia de elementos pro-oxidantes, como el hierro (inyección al nacimiento), que desafían la función antioxidante de la vitamina (Mahan y Vallet, 1997). Por lo anterior, cuando los niveles en el alimento son superiores a los recomendados por el NRC (1998), la concentración de la vitamina en plasma y tejidos es más alta. Sin embargo, se ha encontrado que los niveles de la vitamina E al destete, están disminuidos, probablemente por que las esterasas (enzimas pancreáticas) a esa edad no han desarrollado su actividad para hidrolizar a los tocoferoles. Asimismo, existen algunas interacciones negativas con otros elementos como con la vitamina A (Ching *et al.*, 2002; Moreira y Mahan, 2002) incrementando los niveles de α -tocoferol hacia la tercera o cuarta semana posdestete (Mahan, 2001). Los requerimientos de vitamina E para animales al destete son de 16 UI/ vitamina E/ kg de dieta (NRC, 1998), sin embargo estos pueden llegar hasta 100 UI/ kg de dieta de acuerdo a la cantidad de grasa suplementaria incluida en la dieta para poder sostener niveles adecuados de α -Tocoferol en sangre y tejidos (Moreira y Mahan, 2002).

2.3.2.2. Vitamina C

Entre otros antioxidantes de origen natural, está la vitamina C, la cual es cofactor en gran cantidad de enzimas que intervienen en la hidroxilación de aminoácidos para la biosíntesis de colágena y carnitina (Dove y Cook, 2001), síntesis de catecolaminas, oxitocina; así como catalizador de reacciones de óxido-reducción y como agente reductor neutralizando los radicales libres. El ácido ascórbico tiene una potente actividad sinérgica con el α -Tocoferol (Tsuchihashi *et al.* 1995), regenerando la molécula de la vitamina E en soluciones, membranas y lipoproteínas (Doba *et al.* 1985; Willson, 1987), como se indica en la reacción 5, y cuando la vitamina E es deficiente en la dieta, anulando los subproductos de la oxidación lipídica (Sun *et al.* 2000) expresando así sus efectos antioxidantes como se ha demostrado en dietas para lechones con dosis de vitamina C iguales o mayores a 75 ppm (de Rodas *et al.* 1998).



La absorción del ácido ascórbico es por transporte activo en el intestino delgado (Dove y Cook, 2001). La síntesis de la vitamina C se lleva a cabo en el hígado a partir de la enzima L-gulono γ -lactona oxidasa (GLO) y en los lechones está regulada por la concentración circulante de la vitamina, lo cual puede inhibir la actividad de la GLO y por lo tanto el hígado no produce ácido ascórbico. Cuando la fuente de la vitamina de origen materno desaparece (destete), se incrementa la actividad de la GLO, y 7 días posdestete (a mayor edad al destete, mayor será la síntesis de vitamina), la concentración de vitamina C de origen endógeno, es más elevada que durante la lactancia (Ching *et al.*, 2001b). La principal fuente de ácido ascórbico es la madre en donde la oferta a los fetos es a través de la placenta (gestación tardía) y posteriormente en la lactancia a través de la glándula mamaria, principalmente vía el calostro. Esta suplementación de la cría, coincide con una disminución en la concentración tisular de vitamina C en la cerda. El primer destino del ácido ascórbico de origen materno es la síntesis de tejido conectivo por lo que la concentración puede ser insuficiente para solventar eventos de estrés oxidativo, comunes al momento del parto y durante las primeras semanas de vida (la concentración de la vitamina será más elevada en los primeros lechones en nacer, ya que los últimos enfrentan condiciones de estrés más importantes que agotan las reservas de la vitamina, Mahan y Vallet, 1997; Ching *et al.* 2001a; Ching *et al.* 2001b).

2.3.2.3. Vitamina A

Las formas activas de la vitamina A son el *trans*-retinol y algunos de sus metabolitos, como el ácido retinóico. Entre las principales funciones biológicas que se han demostrado para estas formas son la de crecimiento, diferenciación y

protección de epitelios, lo que es de gran relevancia para ciertas funciones como la visión y la reproducción, así como la transcripción de genes específicos la cual es función propia del ácido retinóico (Olson, 1989; Ross, 1993; Darroch, 2001).

La vitamina A es liberada por la acción de pepsina en el estómago. En el intestino se asocian y forman esteroides de vitamina A los cuales serán hidrolizados por enzimas pancreáticas y de membrana (hidrolasas) de acuerdo al tipo de cadena de éster formado, para ser transformadas en retinol. El retinol se oxida a retinal (reversible) y este a su vez en ácido retinóico (irreversible). El retinal formado a partir de los carotenoides se une a los enterocitos gracias a las Proteínas Celulares Fijadoras de Retinol tipo dos (por sus siglas en inglés, CBRPII) y es entonces cuando se da la reducción a retinol (Ong, 1993; Napoli, 1993). Este se incorpora a micelas junto con ácidos grasos libres, vitaminas liposolubles y ácidos biliares, entre otros compuestos. Después el retinol es esterificado e incorporado a la fracción lipídica de los quilomicrones, los que pasan a circulación linfática, llegando a hígado, órgano que representa cerca del 90% de almacén de esta vitamina (Ross, 1993; Ong, 1993; Darroch, 2001). Cuando la vitamina A es necesaria en otros tejidos del organismo, esta es transportada por las Proteínas Plasmáticas Fijadoras de Retinol (por sus siglas en inglés, RBP; Ross, 1993).

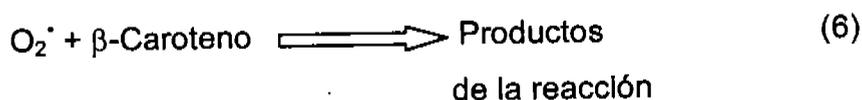
La principal fuente de vitamina A es el aceite de pescado, mientras que los carotenoides están en algunos granos y plantas, sin embargo el aporte de estos no se consideran en la formulación de dietas, por lo que la vitamina debe ser suplementada a los animales (Darroch, 2001).

2.3.3. Pro-vitaminas

2.3.3.1 β -Caroteno

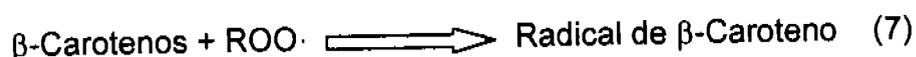
El β -Caroteno actúa como precursor de la vitamina A, conversión que se lleva a cabo en la pared intestinal, a partir de la enzima 15-15' mono-oxigenasa- β carotenasa (antes llamada di-oxigenasa), dando 2 moléculas de vitamina A por una de β -Caroteno, en donde la enzima actúa a nivel central de la molécula. A los efectos de los β -Carotenos se suman los de vitamina A en la proliferación, diferenciación y morfogénesis así como la protección de los tejidos (Olson, 1989; Darroch, 2001). Durante el metabolismo del β -Caroteno se producen algunas moléculas que regulan a la enzima 15' mono-oxigenasa β -carotenasa, disminuyendo su actividad, como en el caso del ácido retinóico a nivel intestinal (Olson, 1989; Bachmann *et al.*, 2002). Las funciones del β -Caroteno en el mantenimiento de la integridad de los epitelios son tan decisivas, que se le ha vinculado con efectos antimutagénicos, anticancerígenos e inmuno-estimulantes en humanos (Chew, 1995).

El β -Caroteno también tiene un fuerte poder antioxidante (reacción 6), ya que su molécula es particularmente susceptible al ataque de los radicales libres y peróxidos (Burton, 1989; Willson, 1987).



Esta función antioxidante está determinada entre otros factores por la reactividad química del antioxidante y de los radicales, el sitio de generación de las especies reactivas (el β -Caroteno es más eficiente dentro de la membrana, en la porción hidrofóbica, mientras que otros antioxidantes como el α -Tocoferol, son más

eficientes en la superficie de dichas membranas), concentración, almacenaje, estabilidad y capacidad de movimiento del antioxidante, así como la presión de oxígeno en el micro-ambiente, ya que en tejidos expuestos a altas presiones de oxígeno, se ha demostrado un efecto pro-oxidante tal es el caso del tejido pulmonar, en donde el β -Caroteno no protege contra la peroxidación lipídica (Burton e Ingold, 1984; Tsuchihashi, *et al.* 1995). El modo de acción de esta pro-vitamina no es preventivo como el caso de ciertas enzimas (SOD y GSH Px), ni interfiere la cadena de oxidación donando hidrógenos, como el caso de la vitamina E y C; esta pro-vitamina participa como co-oxidante, en donde a bajas presiones de O_2 , el β -Caroteno y los subproductos de la reacción formados durante el proceso son moléculas no reactivas o radicales de centros carbonados estables, mientras que a altas presiones de O_2 se da la formación del radical peroxilo de β -Caroteno (reacción 7) el cual puede desencadenar o continuar con el proceso de oxidación (reacción 8) y que suele ser eliminado por el α -Tocoferol (Burton, 1989).



Sin embargo, cuando hay una disminución en la presión de O_2 y el producto de la reacción 7 reacciona con otro radical libre, se forman moléculas estables poco reactivas (Burton, 1989).

La absorción de los carotenos está regulada principalmente por su disponibilidad, localización (intra o extracelular para el caso de las fuentes naturales de la pro-vitamina), la Interacción entre carotenoides y la presencia y tipo de grasa en la dieta (van den Berg, 1999; van het Hof *et al.* 2000). Con la adición de ácidos grasos de cadena larga (12:0 - 18:0), se da la formación, no solo de quillomicrones de β -Caroteno, sino también de vitamina A, haciendo más eficiente la absorción de estas moléculas que cuando se usan ácidos grasos de cadena

corta; Incluso las reservas de la pro-vitamina en el enterocito, serán incluidas en los quilomicrones originados en la siguiente ingesta (Borel *et al.* 1998).

2.3.4. Interacciones entre antioxidantes

La interacción entre antioxidantes es fundamental, ya que la actividad de estos, está ligada a diferentes factores, y entre los más importantes, las condiciones de presión de O₂ en diferentes tejidos. Cuando se presentan situaciones de estrés oxidativo que agotan las reservas de vitaminas como el α -Tocoferol, el β -Caroteno comienza a eliminar radicales libres, afectando la función de la 15-15' mono-oxigenasa β -carotenasa, durante la transformación del carotenoide a vitamina A (Burton e Ingold, 1984; Gessler, *et al.* 2001).

El α -Tocoferol, que ha demostrado interactuar positivamente con la vitamina C (Tsuchihashi *et al.* 1995), pero puede verse afectado negativamente en su concentración a nivel plasmático, cuando se adicionan altos niveles de algunos carotenoides (cantaxantina), sin embargo esto no ha sido observado con el β -Caroteno. Un posible efecto antagónico entre vitamina E y vitamina A por competencia de sitio de absorción puede suceder, cuando ambas vitaminas sobrepasan los requerimientos (Blakely *et al.*, 1991). Cuando los efectos son sinérgicos como en el caso del α -Tocoferol con el ácido ascórbico o con el β -Caroteno, la inmunidad animal se ve favorecida, protegiendo a los tejidos contra la acción patógena de microorganismos (Chew, 1995).

La interacción entre vitamina C y β -caroteno, con niveles adecuados de α -tocoferol se ha estudiado en seres humanos y animales de laboratorio para evaluar la actividad antioxidante en poblaciones susceptibles a estrés oxidativo, por ejemplo los fumadores (Kraus *et al.* 1997; Steinberg y Chait, 1998). Con la suplementación de estos tres antioxidantes, no solo se incrementa su concentración en plasma, también se incrementa su tasa de desaparición y

disminuye el tiempo de producción y propagación de subproductos de la peroxidación lipídica (Steinberg y Chait, 1998).

La adición de β -Caroteno y vitamina C en solución, no ha demostrado tener efecto sinérgico como sucede con esta última y el α -Tocoferol en donde el ácido ascórbico regenera la molécula de la vitamina E y elimina los subproductos de la peroxidación lipídica (Tsuchihashi *et al.* 1995; Sun *et al.* 2000). Sin embargo no se han reportado los efectos de la adición de ambos compuestos *In vivo* y bajo condiciones de producción que permitan el desarrollo de radicales libres que favorezcan la expresión de la actividad antioxidante uno en solución acuosa (vitamina C) y el otro en la fracción lipídica (β -Caroteno).

Las interacciones entre carotenoides han sido observadas durante la absorción y distribución de estos, de acuerdo al tipo de carotenoide y tiempo de dosificación, en donde se ha encontrado que a mayor duración de inclusión de la pro-vitamina, menor será la interacción entre los compuestos (van den Berg, 1999).

La función directa de los antioxidantes, puede ser evaluada, determinando los niveles de Especies Reactivas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), en donde los subproductos de la peroxidación lipídica reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA; Uchiyama y Mihara, 1978). De manera similar, la actividad de las enzimas como la GSH Px, (Lawrence y Burk, 1976), encargadas de la remoción de radicales libres, es un indicador del comportamiento de estos compuestos, ya que a menor actividad de estas, el poder antioxidante de las vitaminas es más eficiente.

3. CONCLUSIONES

- a. Las condiciones de producción que generan estrés en los animales y las fuentes susceptibles de sufrir oxidación en la dieta llevan a situaciones de estrés oxidativo en el animal.
- b. El valor nutricional de las vitaminas, bajo los criterios de formulación vigentes, no considera su requerimiento como fuente antioxidante, salvo en el caso de vitamina E y Se.
- c. El uso de antioxidantes químicos, tales como la Etoxiquina (ETQ), el Butil-hidroxitolueno (BHT), Butil-Hidroxianisol (BHA), Terbutil-hidroxiquinolona (TBHQ) es para proteger el valor nutricional de los ingredientes del alimento balanceado, entre ellos, las vitaminas.
- d. La vitamina C es un antioxidante natural, que actúa principalmente a nivel de soluciones.
- e. El β -Caroteno, al ser una pro-vitamina liposoluble, tendrá preferencia por la fracción lipídica de los tejidos.
- f. La vitamina E es el antioxidante natural por excelencia, pero esta función también ha sido reconocida en otras vitaminas y pro-vitaminas, tal es el caso de la vitamina C y el β -Caroteno.
- g. Las interacciones entre vitaminas y minerales, han sido demostradas para el caso de vitamina E con vitamina C y Se, sin embargo, existe escasa información respecto a la interacción existente con β -Caroteno.

4. JUSTIFICACIÓN

Por lo anterior y bajo los criterios de formulación actuales para lechones (en donde las fuentes de grasas y aceites de origen vegetal en las dietas pre-iniciadoras han adquirido importancia), aunado a las condiciones de manejo durante el periodo de destete, se propuso el presente ensayo.

5. HIPÓTESIS

Los niveles altos de vitamina C y de β -caroteno incluidos en la dieta de lechones recién destetados bajo condiciones de estrés, mejorarán su comportamiento productivo al potenciar y diversificar los efectos de Se y de vitamina E como antioxidantes.

6. OBJETIVOS

Evaluar indirectamente, con el comportamiento productivo de los lechones, la respuesta a la inclusión de los antioxidantes vitamina C y β -caroteno, en condiciones que favorecen el estrés oxidativo.

Medir los efectos de la adición de vitamina C y β -caroteno a la dieta de lechones, desafiados por estrés oxidativo, sobre la posible prevención de subproductos de la peroxidación lipídica, así como en la actividad de la enzima Glutathion peroxidasa en el plasma sanguíneo.

1 **7. VITAMIN C AND β -CAROTENE AS ANTIOXIDANTS**

2 **IN DIETS FOR PIGS AT WEANING**

3 D. M. Fernández¹, G. Borbolla², G. Mariscal³, E. Ramírez³, J. A. Cuarón^{3*}.

4
5 ¹ Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y la Salud
6 Animal, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C). Cuautitlán Izcalli,
7 Estado de México, Méx.

8 ² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma
9 de México (UNAM), Ciudad Universitaria, DF, México.

10 ³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP),
11 Ajuchitlán, Colón, Querétaro.

12 * To whom correspondence should be addressed:

13 Km. 1 Carretera a Colón

14 Ajuchitlán, Colón Qro.

15 C.P.76280.

16 Telephone: (419) 292-00-33, e-mail:

17 Apartado postal 1-1168

18 Santiago de Querétaro, Qro.

19 C.P. 76001.

20 Telephone: (419) 292-00-36, e-mail: cuaron.jose@inifap.gob.mx

21

22

23

7.1. Abstract

24 Two experiments were conducted to evaluate performance of pigs supplemented
25 with vitamin C and β -carotene under commercial and experimental farm conditions.
26 In Experiment (Exp.) 1, a total of 220 pigs weaned at 22.1 ± 1.7 d and 5.5 ± 1.2 kg of
27 body weight were used; Exp. 2 included 64 animals weaned at 20.2 ± 0.9 d and
28 5.8 ± 1.1 kg of body weight. Pigs in Exp.1 were randomized in a Complete Block
29 Design with 11 replicates (pens of 5 pigs) per treatment. In Exp.2, pigs were
30 completely randomized to 4 replicates (pens of 4 pigs) per treatment. Raw canola
31 oil (Exp.1), and tallow (Exp.2), were used as supplementary energy sources; prior
32 use, storage of these ingredients (49 days) was under weaning room conditions
33 (27 - 32°C and 87-100% relative humidity) to favor oxidation. Dietary treatments
34 were in both Experiments: 1) Control (CON); 2) Addition of Vitamin C, $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
35 and no β -carotene (VC); 3) Addition of β -carotene, $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and no Vitamin C
36 (βC), and 4) Vitamin C, $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and β -carotene, $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ were added to the
37 (VC β C). Peroxides were determined for canola oil, tallow and diets, while Vitamin
38 C and β -carotene were measured only in the final diets. Productive performance
39 was measured in both experiments, Exp. 1 for 24 days and 20 days, Exp 2. In Exp.
40 1, blood samples were collected from two pigs per pen to determine the
41 Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) and the Glutathione peroxidase
42 (GSH-Px) activity. In Exp.1, there were no differences ($P > 0.13$) in average feed
43 intake (AFI: 0.404, 0.379, 0.393 and 0.409 kg/d), average daily gain (ADG: 0.303,
44 0.280, 0.303 and 0.306 kg) and feed efficiency (FE: 0.755, 0.745, 0.769 and 0.746

45 kg), for CON, VC, β C and VC β C treatments, respectively. The GSH-Px activity
46 ($P>0.20$) and TBARS ($P>0.17$) in plasma were not different between treatments. In
47 Exp. 2, because VC and β C diets apparently reduced AFI (interaction, $P<0.05$),
48 while a transient β -carotene effect ($P<0.05$) was evident in ADG during the second
49 half of the Experiment (0.27 vs. 0.24 kg), thus resulting in a slight numerical
50 difference in favor of β -carotene and Vitamin C dietary additions in FE. Lack of a
51 clear response to the experimental antioxidants may be explained by the presence
52 in surplus amounts of Vitamin E and Selenium, plus the regular addition of
53 inorganic antioxidant compounds.

54 Keywords: weaned pigs, vitamin C, β -carotene, TBARS, GSH-Px.

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

7.2. Abbreviations

69 ADG = Average Daily Gain

70 AFI = Average Daily Feed Intake

71 AOAC = Association of Official Analytical Chemists

72 CON = Control Treatment

73 CP = Crude Protein

74 Exp = Experiment

75 FE = Feed Efficiency

76 GLM = General Linear Models

77 GLO = L-gulonolactone oxidase

78 GSH-Px = Glutathione peroxidase

79 HCl = Hydrochloride

80 ME = Metabolizable Energy

81 NADPH = Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

82 NRC = National Research Council

83 PRRS = Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome

84 PUFA = Polyunsaturated Fatty Acid

85 RCBD = Randomized Complete Block Design

86 RCD = Randomized Complete Design

87 SAS = Statistical Analysis System

88 Se = Selenium

89 TBARS = Thiobarbituric Acid Reactive Species

90 Trp = Tryptophan

- 91 VC = Vitamin C Treatment
- 92 VCβC = Vitamin C + β-carotene Treatment
- 93 Zn = Zinc
- 94 βC = β-Carotene Treatment
- 95
- 96
- 97
- 98
- 99
- 100
- 101
- 102
- 103
- 104
- 105
- 106
- 107
- 108
- 109
- 110
- 111
- 112
- 113

115 Polyunsaturated fatty acids (PUFA) in diets for pigs at weaning are important to
116 reach appropriate energy levels and to ensure essential fatty acids provision,
117 helping in the immune status and depending on PUFA source, as canola, soybean
118 or fish oils (Thies *et al.*, 1999; Bazinet *et al.*, 2003). However, these PUFA are
119 highly susceptible to oxidation, inducing damage of the lipid fraction of cell
120 membranes (Willson, 1987; Dibner, *et al.* 1996; Wander *et al.* 1997). Cell damage
121 is particularly critical during stress conditions such as those at weaning, where
122 animal growth rate is intense and metabolic requirements higher (Reis de Souza
123 and Mariscal, 1997; Morgan *et al.*, 1999; Dröge, 2002). An accelerated metabolic
124 rate increases oxygen consumption and thus, increases production of reactive
125 species with the capability of oxidizing PUFA (Lauridsen *et al.* 1999; Dröge, 2002).
126 Therefore, the oxidative potential of the diet is relevant and the use of nutrients as
127 antioxidants (such as vitamin E and Se, in surplus) is a common practice in
128 commercial diet formulation for swine.

129 Vitamin C (ascorbic acid) is present, among others, as a cofactor for enzymes in
130 collagen, carnitine and catecholamines synthesis. Vitamin C acts as a catalyst in
131 oxidation-reduction reactions; as a reducing agent neutralizes free radicals. It has
132 been shown that ascorbic acid has a strong synergic activity with α -Tocopherol
133 (Tsuchihashi *et al.* 1995), regenerating its molecule in solutions and in cell
134 membranes (Doba *et al.* 1985). The antioxidant role of vitamin C has been
135 demonstrated in swine diets, at levels of 75 ppm or greater (de Rodas *et al.* 1998).

136 Another compound with antioxidant effects is β -Carotene, because the molecule of
137 this compound is highly susceptible to attack by peroxides (Burton, 1989). β -
138 Carotene acts as a precursor of vitamin A, and the conversion takes place in the
139 enterocyte membrane (two molecules of vitamin A form one of β -Carotene,
140 Darroch, 2001). Therefore, β -Carotene may have added effects to those of vitamin
141 A function in the protection and proliferation of the enterocytes membrane, which
142 may be critical at weaning.

143

144 The objective of this experiment was to evaluate the antioxidant effect of vitamin C
145 and/or β -Carotene to avoid the oxidative stress *in vivo* as a mean to ensure better
146 performance of pigs at weaning.

147

148

7.4. Materials and methods

149 Animals were humanely kept and handled at all times, in accordance with the
150 Mexican Official Legislation for the use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-
151 1999).

152 The present report includes results of two similar experiments conducted under
153 different environmental and managerial constraints.

154 Dietary treatments in both experiments were as follows: 1) Control (CON) no
155 vitamin C or β -Carotene were added to the diet; 2) vitamin C, 150 and β -Carotene,
156 0 mg·kg⁻¹ (VC); 3) vitamin C, 0 and β -Carotene, 350 mg·kg⁻¹ (β C); 4) vitamin C,
157 150 and β -Carotene, 350 mg·kg⁻¹ of the diet (VC β C).

158 Vitamins and minerals premixes were added to the diet to meet or surpass the
159 NRC (1998) recommendations (Table 1). Etoxiquin (66%) at a dose of 125 g/kg of
160 premix, was added to the vitamin premix, as an antioxidant agent.

161 Samples of the Raw canola oil, tallow and the experimental diets were taken and
162 analyzed by titration for peroxides using the AOAC (2000) official method 965.33.
163 Effectiveness of diet formulation and mixing was verified by analyzing Crude
164 Protein (C.P.) content by Titration method of Kjeldhal (Kjelte 1035, Tecator) and
165 vitamin C (by Iodine Titration method, DSM Labs., Jalisco, México.) and β -carotene
166 (by Spectrophotometer method at 492-496 wavelengths, DSM Labs., Jalisco,
167 México.) concentrations.

168 **7.4.1. Experiment 1 (Exp.1)**, was conducted in a commercial farm, where the
169 intensive production system and animal health status were severely challenged by
170 presence of diseases of the respiratory syndrome (*Mycoplasma ssp.*,
171 *Streptococcus suis*), aggravated by a severe drop of immunity 10-16 days post-
172 weaning due to the Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome virus serum
173 conversion, resulting in a high mortality rate (historically, 2.3%) during the third
174 post-weaning week.

175 A total of 220 piglets (Dam line, Seghers 7 tons \times Sire line, PIC 337) were used in
176 a Randomized Complete Block Design (RCBD), whereby two vitamin C and two β -
177 carotene levels were factorially imposed. Blocks were 2 nursery rooms. Each
178 treatment had 11 replications (cages), and 5 pigs per cage.

179 After 22.1 ± 1.7 days of lactation, light weigh-susceptible piglets (5.5 ± 1.2 kg) were
180 weaned to nursery rooms provided with an ambient temperature of 26 to 32°C
181 (32°C during the first post-weaning week, which was allowed to drop by 2°C per
182 week), through automated electric furnaces and natural ventilation assisted by
183 exhaust fans.

184 Supplementary energy source for experimental diets was raw canola oil obtained
185 by mechanic extraction, without the addition of antioxidants (La Corona, Edo. De
186 México). This oil source was used for its high PUFA content. To favor oxidation,
187 raw canola oil was stored for 49 days under weaning room conditions (27 to 32°C
188 and 80 to 100% relative humidity) before adding it to the experimental diets. During
189 lactation, piglets were offered the CON phase-1 diet; after the weaning pigs
190 received the experimental diets through a feeding program: a phase-1 diet, from
191 day 1 to day 10 after weaning and a phase-2 diet, offered from day 11 to 24 post-
192 weaning (Table 1).

193 Feed and water were offered *ad libitum* throughout the study. Body weight at
194 weaning used for randomization, from out-come groups formed from litters of
195 origin. Body weight was recorded at weaning (day 0) and then at day 5 and 10 in
196 phase-1, and days 17 and 24 in phase-2. Average daily weight gain (ADG) was
197 calculated for each weighing periods. Feed was offered in 4 meals per day (0600,
198 1200, 1800 and 2400h) to stimulate feed intake; feeding interval was reduced to 3
199 meals (0800, 1600 and 2400 h) from day 11 postweaning. Rejected feed was
200 recorded (and discarded) on each of the piglets weighing days, to calculate the

201 average of dally feed intake (AFI) for the period (days 5, 10, 17 and 24). Feed
202 efficiency (FE) was expressed as ADG/AFI.

203 *Laboratory analyses.* Two plgs per pen were bled at weaning and on days 12 and
204 24 post-weaning by jugular vein puncture, using a 20 gauge × 38mm needle and a
205 syringe. Blood was collected in heparinized glass tubes (13×100mm) and placed
206 on ice for about 30 minutes, until centrifugation at 260 G (1500 rpm) for 10 minutes
207 at 4°C. Plasma was separated and stored at -60°C for later determination of
208 Protein, Glutathione peroxidase (GSH-Px) and Thiobarbituric Acid Reactive
209 Species (TBARS).

210 *Protein levels in plasma.* Plasma Protein was determined by the Lowry (1990)
211 assay; plasma samples were diluted 1/32 in distilled water, to reach the
212 absorbances rank of the porcine albumin standard (at 750nm wavelength) in a
213 UV/VIS 920 (GBC) spectrophotometer.

214 *Glutathione Peroxidase (GSH-Px).* Enzyme activity was determined
215 spectrophotometrically in accordance to Lawrence & Burk (1976), and NADPH
216 oxidized per minute per mg of protein was evaluated. The slope describing activity
217 was determined after 5 minutes by reading in a UV/VIS 920 (GBC)
218 spectrophotometer at a 340nm wavelength.

219 *Lipid oxidation.* Plasma was spectrophotometrically evaluated following the
220 Uchlyama *et al.* (1978) method, to determine Thiobarbituric acid reactive species
221 (TBARS) produced per mg of protein, measured as the difference at 535 and 520
222 nm wavelengths, in a UV/VIS 920 (GBC) spectrophotometer.

223 **7.4.2. Experiment 2 (Exp.2).** The growth performance trial was identical, In
224 Treatment planning, to Exp. 1, except that a more aggressive diet (Table 1): lower
225 in lactose, higher in soybean meal, absence of antibiotics and oxidized tallow
226 (managed as previously described for canola oil), was used to favor oxidative
227 stress in the piglets during the experimental period. Aside from feed ingredients
228 use, nutrients profiles of the diets were similar to those used in Exp. 1.

229 A total of 64 cross breed piglets (Landrace x Duroc) at weaning (20 ± 0.9 days of
230 age and 5.8 ± 1.1 kg of body weight) were used for a Completely Randomized
231 Design in the factorial arrangement of two vitamin C and two β -carotene levels (as
232 previously described), which included 4 replicates (piglet cages) per treatment and
233 4 pigs per cage.

234 Housing and management conditions were harsher than for Exp. 1. The nursery
235 provided wire mesh flooring cages and room temperature was not as well
236 controlled. First week post-weaning room temperature fluctuated (night to day-light
237 hours) between 21 and 26°C, while after the second week post-weaning,
238 temperature minimum was registered as low as 14°C, as allowed by natural
239 ventilation. Feed and water and water provision were similar to Exp. 1, except that
240 no pre-starter feed was used prior weaning; phase-1 feed was used for 10 days
241 and phase-2 feed (Table 1), was offered from day 11 to 20 post-weaning.

242 Individual piglet body weight was recorded at weaning and every five days until the
243 end of the experimental period (20 days post-weaning), to calculate ADG, AFI and
244 FE as described in Experiment 1.

245 *Statistical analyses.* Data were subject of an analysis of variance under the
246 Experimental Models described (Steel and Torrie, 1960), which was facilitated by
247 the General Linear Models (GLM) procedures of SAS (2002), being planned
248 comparisons those for the factorial arrangement: major effects of vitamin C, β -
249 carotene and their interaction. Glutathione peroxidase activity (as nmol NADPH
250 oxidized/mg of protein/min) and TBARS production (as TBARS μ mol/mg of protein)
251 was determined at 0 (weaning), 12 and 24 days postweaning using GLM
252 procedures and Orthogonal Polynomials to identify lines tendencies (SAS, 2002).

253

254

7.5. Results

255 Crude Protein levels for each Experiment and feeding phase were confirmed
256 (Exp.1, 21.07 and 20.50; Exp.2, 20.90 and 19.72 for Phase 1 and 2, respectively).
257 Analyzed Vitamin C and β -carotene concentrations in Experimental diets are
258 shown in Table 2. Student *t* Test was made, and no differences between vitamin C
259 and β -carotene levels in the diet *versus* expected levels for each Treatment were
260 found.

261 *Experiment 1.* Level of peroxidation in the canola oil used in Exp. 1 was reported to
262 be 7.98 meq·kg⁻¹. Levels of peroxidation in diets were too low to be detected by
263 AOAC official methods, basically because the meq·kg⁻¹ apported by the oil sources
264 were diluted by all the ingredients on the diet, and because the etoxiquin level (as
265 antioxidant in the vitamin premixes) could be sufficient to prevent the oxidation in
266 other ingredients. Initial weight was not different among treatment groups ($P>0.98$).

267 Productive performance is presented in Table 3 where inclusion of vitamin C or β -
268 carotene alone or in combination had no effect on AFI, ADG and FE in any of the
269 periods evaluated ($P>0.20$) under commercial conditions.

270 Glutathione peroxidase activity was the same ($P>0.39$) at the weaning day (0.024,
271 0.025, 0.020 and 0.018 μmol of NADPH oxidized/mg of protein/min) and the
272 response in the activity was constant throughout the experimental period, however
273 enzyme activity was slightly higher ($P<0.20$) in the control treatment group, at the
274 end of the experimental period (0.026, 0.018, 0.015 and 0.014 μmol of NADPH
275 oxidized/mg of protein/min) as is shown in Table 3.

276 Thiobarbituric acid reactive species production, were not different ($P<0.18$)
277 between treatments. Treatment added with vitamin C at $150\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (treatment 2),
278 shown a slightly decrease in TBARS production since the start of the experiment,
279 while β -carotene treatments (βC and $\text{VC}\beta\text{C}$) reduced the TBARS after the second
280 period (12 days) and kept constant until the end of the experimental period as is
281 shown in Table 3. Glutathione peroxidase or TBARS time response trends were
282 analyzed and no differences were found for enzyme activity ($P>0.82$) or lipid
283 peroxidation ($P>0.45$).

284 *Experiment 2.* Peroxidation level for tallow was $17.21\text{ meq}\cdot\text{kg}^{-1}$. Dietary peroxide
285 value was undetected, first of all because the $\text{meq}\cdot\text{kg}^{-1}$ of tallow detected might be
286 diluted in all the ingredients in the diet, and secondly because the presence of the
287 antioxidant (etoxiquin 66%) in the premixes could be sufficient to avoid the
288 oxidation of other nutrients. Performance parameters in Exp. 2 is shown in Table 4.
289 Initial weight was not different ($P>0.99$) among treatment groups (5.80, 5.77, 5.75

290 and 5.84 kg). During the period from 1 to 10 days post-weaning the performance
291 response to AFI ($P<0.36$), ADG ($P>0.94$) and FE ($P<0.91$) was not different.
292 Nevertheless, there were an interaction for the AFI ($P<0.05$) in the second period
293 (11 to 20 days) and the whole experimental period ($P<0.05$), where the control diet
294 and the addition of vitamin C and β -carotene (treatment 4) shown a better
295 response, 7% and 13% respectively above the vitamin C or β -carotene added
296 independently. Unless a 16% increase in ADG for VC β C treatment and 14% for
297 VC, β C and VC β C *versus* CON diet in FE from day 11 to 20, accumulated ADG
298 and FE were not different at the end of the experimental period as is shown in
299 Table 4.

300

301

7.6. Discussion

302 **7.6.1. Growth performance**

303 Peroxide levels in canola oil and tallow (7.98 and 17.21 meq·kg⁻¹, respectively)
304 did not affect AFI, ADG or FE when vitamin C and/or β -carotene were added as
305 antioxidants on the diet. Other authors reported similar results, when pigs weaned
306 at 18 days of age were used in growing and finishing periods, and fed diets with
307 2.0 to 2.6% of canola oil (Leskanich *et al.* 1997; Innis and Dyer, 1999), without any
308 effect on ADG; nevertheless in the later study, FE was increased in the second trial
309 (Innis and Dyer, 1999). When oxidized tallow was fed for 35 days, De Rouche *et al.*
310 (2004), found a decrease on AFI ($P<0.04$) and a linear response ($P<0.001$) to
311 peroxide levels increase (from 40 to 105 meq·kg⁻¹), since day 7, when pigs were
312 weaned at 21 days. In the same study, FE was less than Control treatment

313 (P<0.04). Lower quantity of peroxide levels (no more than 40 meq·kg⁻¹) in the
314 canola oil and tallow fed in our experiment, the presence of synthetic antioxidants,
315 and the dilution of the meq·kg⁻¹ in the energy sources with all the ingredients of the
316 diet, could explain the lack of the response of vitamin C and β-carotene.

317 In the present study, animal performance was no different when ascorbic acid
318 was added on early weaned pigs (21 days), and thus, either vitamin and pro-
319 vitamin inclusion were not important on ADG, AFI or FE in the Exp. 1. Nevertheless
320 VCβC treatment has a better response (16%) on ADG than CON, and 14% in FE
321 for all treatments added with vitamin C and/or β-carotene *versus* CON in the
322 second period (11 to 20 days) for Exp. 2, the response on ADG and FE for the
323 whole period was not important. In the Exp. 2, an interaction was observed when
324 vitamin C and β-carotene were fed together when Treatment 4 reach the same
325 level of AFI for the whole period (20 days), but with any effect on ADG or FE. Our
326 results are in agreement with those findings of Yen and Pond (1983, 1984) in
327 nursing and weanling pigs for growth performance when vitamin C was added; and
328 even when ascorbic acid concentration in plasma was increased. In the same
329 study, authors found an increase of 21% in ADG, 16% in AFI and 4% in FE when
330 carbadox was included in the diet. In broilers Arrieta *et al.* (1999) did not reported
331 any positive response using 400 ppm of vitamin C in the growing and finishing
332 diets. However, results are different from those observed by Yen and Pond (1981),
333 Mahan *et al.* (1994) and De Rodas *et al.* (1998), where the inclusion of vitamin C
334 for the first 14 days, resulted in positive effects on AFI and ADG in pigs weaned
335 between 14 to 21 days of age. Furthermore, plasma ascorbic acid concentration

336 increase linearly (Yen and Pond, 1981), and Fe levels decrease acting as a
337 prooxidant, while Mahan *et al.* (1994), did not observed any response in plasma
338 vitamin level. In other experiment (De Rodas *et al.* 1998), ADG shown a linear
339 response ($P<0.1$) up to 150 ppm ascorbic acid addition for 42 days postweaning. In
340 pigs, vitamin C synthesis depends on glucose availability and liver-L-gulono γ -
341 lactone oxidase enzyme (GLO). In fetal pigs, GLO activity is high in the middle
342 gestation (60 days), when the enzyme expression is decrease and liver vitamin C
343 concentration in late gestation increase; vitamin C is detected in the mammary gland
344 in the second half of the gestation period, at the same time that ascorbic acid is
345 present in the fetus, but after the birth the sow is the most important source of the
346 vitamin during the nursing period (Ching *et al.* 2001a). Possibly, the presence of
347 vitamin C levels in colostrum and milk inhibit the expression of GLO and the
348 vitamin synthesis in nursing pigs, when tissues levels of ascorbic acid are not
349 important. Two weeks postweaning the GLO enzyme is expressed and vitamin C
350 synthesis increased (Yen and Pond, 1983; Ching *et al.*, 2001b). Probably, the
351 inclusion of ascorbic acid after weaning (20 or 24 days), in both experiments,
352 suppress the natural expression of the GLO enzyme and the ascorbic acid
353 synthesis.

354 Information is scarce in growth performance for weaned pigs fed β -carotene. In
355 animals weaned at 35 days of age, and fed diets containing β -carotene during the
356 growing and finishing periods, showed an improved in ADG, and an increase in
357 serum and liver levels of the vitamin when compared to control fed pigs
358 (Wellenreiter *et al.*, 1969). Contrarily, Kraus *et al.* (1997) observed a negative

359 response in ADG when vitamin E, vitamin C and β -carotene were supplemented as
360 antioxidants to rats fed Zinc (Zn) deficient diets. However, when the level of Zn was
361 corrected, an improve in the performance was observed, without any effect of the
362 antioxidants added to the diet, which is in agreement with our results.

363 Animal performance seems to have a better response to Treatments for AFI
364 throughout the Exp.2, compared with Exp. 1, probably because the challenge
365 imposed in the second trial as the lack of pre-starter diet or the no addition of
366 antibiotics, was more severe than Exp.1. Nevertheless, pig performance at the end
367 of the experimental period was higher in Exp.1.

368

369 **7.6.2. Enzyme activity**

370 Glutathione peroxidase activity was not different between treatments or sampling
371 periods. This results is in agreement with those found by Mahan *et al.* (1994)
372 where no response was observed in the activity of the enzyme, when 500 ppm of
373 ascorbic acid was added for 35 days in weanling, growing and finishing periods.
374 The same response was reported by Kraus *et al.* (1997) in rats, when vitamin C,
375 vitamin E and β -carotene were included in Zn deficient diets. Probably, the use of
376 other nutrients as acts as antioxidant (Se), were not improved when the vitamins
377 were added. Selenium transference from the sow could be sufficient to satisfy the
378 mineral requirements for the enzyme activity, after 6 days of age. Late gestation
379 (after 70 days) is the most critical period in the supply of Se from the dam, because
380 when a linear decrease in the level of this trace element occurs (Mahan and
381 Peters, 2004). In the pig, selenium is not only required for the synthesis of the

382 GSH-Px, but is an important cofactor of the selenoenzymes and it is stored in the
383 tissues as selenoaminoacids (principally selenomethionine) and used in the tissues
384 and required only in some specific catabolic states (Mahan and Kim, 1996; Mahan,
385 2000; Mahan and Peters, 2004). Selenium supply from the sow, and adequate Se
386 levels in gestation and lactation diets, associated with the antioxidant activity of
387 other enzymes as the superoxide dismutase (SOD), might explain why in the
388 present study, the enzyme activity was not different throughout the experimental
389 period or among treatment groups, preventing oxidative stress at the birth and
390 during the nursing period masking the ascorbic acid or β -carotene effects. Lei, *et*
391 *al.* (1998) observed that GSH-Px plasma activity in pigs weaned at 28 days of age
392 was different when Se was added at 0 to 0.3 mg·kg⁻¹ of the diet. Selenium levels in
393 our experimental diets, met the NRC (1998) recommendations, which possibly
394 could explain the expression of the enzyme activity for all treatments when PUFA
395 were attacked by the oxidative stress agents and this oxidation was not sufficient to
396 impair the GSH-Px activity.

397 GSH-Px activity throughout the 24 days experimental period in Exp.1 was not
398 different among treatments, however other authors (Mahan and Parret, 1996;
399 Mahan *et al.* 1999) have been reported a quadratic response using two Se sources
400 (organic and inorganic) at two different levels (0.05 and 0.5 ppm in the diet) during
401 the growing and finishing period. Contrarily, Kim and Mahan (2001) shown an
402 increase in the GSH-Px units in animals between 3 to 12 weeks of age, when Se
403 was included at toxicity levels (20 ppm). In the present study, high levels of
404 ascorbic acid and/or β -carotene seemed to be not important for removing free

405 radicals, and with adequate levels of Se in the diets sufficient for the age, therefore
406 enzyme activity was not affected, positively or negatively, by the addition of other
407 antioxidant nutrients.

408

409 **7.6.3. Lipid peroxidation**

410 Five percent of canola oil inclusion did not affect the Thiobarbituric Acid Reactive
411 Species (TBARS) on weaned pigs plasma, when the animals were supplemented
412 with vitamin C or β -carotene. Similarly, Nagy *et al.* (2003) reported that plasma
413 TBARS levels in pigs were not affected when long chain PUFA were fed, but liver
414 and red blood cells peroxidation subproducts were higher, probably because the
415 lipid component in the membrane in those tissues was more susceptible to
416 oxidative harm. In the present study, the α -tocopherol used in the experimental
417 diets, probably acted as antioxidant, protecting the circulating lipid fraction, then
418 TBARS in other tissues should be measured to evaluate the damage of the PUFA
419 associated to membranes. For this reason, natural antioxidants tested in this
420 experiment could be more efficient, specially β -carotene as a liposoluble pro-
421 vitamin.

422 Our results were different from those findings from Leskanich *et al.* (1997) in other
423 tissues (*longissimus dorsi* muscle) in growing and finishing pigs fed with canola oil
424 at 2%, where the TBARS increased, probably because the proportion of
425 monounsaturated and polyunsaturated fatty acids used by Leskanich *et al.* (1997) were
426 higher (18:1 and 18:2). Other authors observed increased levels of TBARS on
427 intestinal epithelium of rabbits and pigs when animals were fed with vegetable

428 energy sources (vegetable oils) and oxidative damage was induced (Rey *et al.*
429 1996; López Bote *et al.* 2001). Lack of differences on TBARS levels during the
430 experimental period could be explained by the adequate vitamin E levels, which
431 could be sufficient to avoid the presence of reactive species in tissues, as López
432 Bote *et al.* (2001) reported when finishing pigs were supplemented with vitamin E.
433 Thiobarbituric acid reactive species production in plasma of weaned pigs was not
434 affected by the addition of vitamin C in our experiment, as Plon *et al.* (2004)
435 demonstrate when 1,000 to 2,000 mg of the vitamin was included in the beverage
436 water for finishing swine and pork chops obtained did not demonstrate any decrease
437 in the TBARS levels. Other authors shown that vitamin E, vitamin C or β -carotene
438 reduced TBARS in lung tissue of broilers in productive periods which favors the
439 oxidatve stress (Arrieta *et al.* 1999), or decrease the TBARS levels in red blood
440 cells in Zn deficient rats, supplemented with the antioxidant vitamins (Kraus *et al.*
441 1997). Lung tissue and red blood cells could be more susceptible to oxidation for
442 the higher oxygen pressure, and then the O[·] molecule is more susceptible to react
443 with the lipid component of the membrane, therefore the antioxidant effect in those
444 tissues could be clearer by the affinity of some of them (vitamin E and β -carotene),
445 while vitamin C, as hidrophilic compound could have a sinergic effect with β -
446 carotene, regenerating its molecule as its occurs with vitamin E (Böhm *et al.* 1998).
447
448
449
450

7.7. Conclusions

451

452 Pig performance was not improved on early weaned pigs (21 days of age) when
453 vitamin C and β -carotene were included at 150 and 350 mg·kg⁻¹ of diet during 24
454 days postweaning under commercial conditions or 20 days in experimental farm,
455 either when the oxidized energy source used was raw canola oil or tallow. Peroxide
456 levels on the ingredients used in the diets should be greater than those reached by
457 canola oil and tallow for the present study, to affect negatively animal performance.
458 Other nutrients, as vitamin E and Se were adequate in the experimental diets,
459 probably for that reason, the effect of vitamin C and β -carotene could be irrelevant
460 in the productive response of pigs. Glutathione peroxidase activity and TBARS
461 levels indicate that antioxidants included naturally on the diet as vitamin E, Se, and
462 synthetic antioxidants as etoxlquin, were sufficient to prevent oxidative stress.

463 7.8. Tables

464 Table 1. Diets composition and nutrient calculated analysis for Exp. 1 and 2.

465	EXPERIMENT 1				EXPERIMENT 2				
	Day 0 to 10		Day 11 to 24		Day 0 to 10		Day 11 to 20		
	1 & 2	3 & 4	1 & 2	3 & 4	1 & 2	3 & 4	1 & 2	3 & 4	
466	TREATMENTS ^a								
467	Ingredients, %								
468	<hr/>								
469	Whey, milk, dehydrated	28.60	28.30	20.30	20.00	18.00	18.00	0.00	0.00
470	Soybean meal, 47%	12.00	12.00	16.00	16.00	18.00	18.00	22.00	22.00
471	Corn, yellow 8%	11.87	11.30	16.20	15.92	9.27	9.00	12.00	12.00
472	Sorghum, grain 8.9%	10.00	10.00	17.30	17.01	10.00	10.00	34.63	34.08
473	Oats, whole grain	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	12.00	12.00
474	Fish, meal	7.00	7.00	7.00	7.00	0.00	0.00	0.00	0.00
475	Lactose, 98%	0.00	0.00	0.00	0.00	8.40	8.25	0.00	0.00
476	Whey, milk, re-fatted	6.20	6.60	2.00	2.50	6.10	6.30	6.00	6.00
477	Canola, oil	5.00	5.00	5.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00
478	Egg, whole, dehydrated	4.00	4.00	4.00	4.00	6.00	6.00	4.80	4.80
479	Soybean protein conc. 67%	3.15	3.26	0.00	0.00	6.31	5.80	0.00	0.00
480	Tallow	0.00	0.00	0.00	0.00	4.60	4.90	4.00	4.20
481	Sodium, chloride	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
482	Zinc, oxide	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.00	0.00
483	Calcium, carbonate	0.38	0.38	0.38	0.38	0.70	0.70	0.81	0.81
484	Mono di calcium phosphate	0.37	0.37	0.37	0.37	1.23	1.25	1.85	1.84
485	L-Lysine, HCl + L-Trp	0.37	0.37	0.39	0.39	0.39	0.42	0.65	0.66
486	Vitamin, premixes ^b	0.36	0.72	0.36	0.72	0.36	0.72	0.36	0.72
487	Antibiotics ^c	0.23	0.23	0.25	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00
488	Yeast, <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.30	0.30	0.00	0.00
489	DL-Methionine	0.15	0.15	0.12	0.12	0.19	0.20	0.13	0.13
490	L-Threonine	0.12	0.12	0.13	0.14	0.15	0.16	0.28	0.27
491	Butirate	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.00	0.00

492	Trace mineral, premixes ^d	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
493	Extract, <i>Y. shidiggera</i>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00

494

495

	EXPERIMENT 1		EXPERIMENT 2		
Calculated Analysis	Day 0 to 10	Day 11 to 24	Day 0 to 10	Day 11 to 20	
496					
497	ME MJ/kg	15.08	14.66	15.08	14.66
498	CP, %	21.74	20.95	21.45	19.35
499	Digestible Lysine, %	1.42	1.35	1.42	1.35
500	Lactose, %	24.04	15.97	24.00	2.82
501	Selenium, ppm	0.41	0.43	0.30	0.36
502	Vitamin E, UI/g	0.15	0.10	0.09	0.06

503

504 ^a 1 (CON), vitamin C 0mg· kg⁻¹ and β-carotene 0mg· kg⁻¹ of the diet; 2 (VC), vitamin C 150 mg· kg⁻¹ and β-carotene 350
505 mg· kg⁻¹; 4 (βC), vitamin C 0mg· kg⁻¹ and β-carotene 350mg· kg⁻¹; 4 (VCβC), vitamin C 150mg· kg⁻¹ and β-carotene
506 350mg· kg⁻¹.

507 ^b Total vitamin in the diet, supply: Chloride, 0.03%; vitamin A, 10.02 UI/g; vitamin D, 1.98 UI/g; vitamin E, 0.06 UI/g;
508 vitamin K, 2.40 mg/kg; Riboflavine, 7.20 mg/kg; vitamin B₁₂, 0.04 mg/kg; Coline, 708.00 mg/kg; Niacine, 40.80 mg/kg;
509 Pantothenic acid, 50.01 mg/kg; Thiamine, 1.74 mg/kg; Piridoxine 2.11 mg/kg; Biotine, 0.20 mg/kg; Folic Acid, 1.95
510 mg/kg.

511 ^c Phase 1, Carbadox + (Tylosine + sulphametazine); Phase 2, Carbadox + Tilmicosine.

512 ^d Total trace mineral in the diet, supply: Sulphur, 0.02%; as mg/kg: Cobalt, 0.72; Copper, 14.40; Iron, 120.00;
513 Manganese, 36.00; Selenium, 0.30; Iodine, 0.96; Zinc, 144.00) .

514 Table 2. Vitamin C and β -Carotene concentration in Experimental diets.
 515
 516

517		Phase 1, day 0 to 10			Phase 2, day 11 to 24		
518		Vit. C	β -Carotene	MSD ^a	Vit. C	β -Carotene	MSD ^a
519	Levels in the diet, mg·kg ^{-1b}	150	350		150	350	
520	Treatments, mg·kg ^{-1c}						
521	CON	N.D. ^d	0.06	—	N.D. ^d	0.28	—
522	VC	142.05	0.00	7.95, 0.00	144.86	0.00	5.14, 0.00
523	BC	0.00	347.08	0.00, 2.92	0.00	356.56	0.00, 6.56
524	VC β C	141.35	349.89	8.65, 0.11	142.32	347.38	7.68, 2.62

525 ^a Maximal Standard Deviation.

526 ^b Pretended levels of vitamin C and β -Carotene in the diet.

527 ^c CON, vitamin C 0mg·kg⁻¹ and β -Carotene 0mg·kg⁻¹ of the diet; VC, vitamin C 150 mg·kg⁻¹ and β -Carotene 350
 528 mg·kg⁻¹; β C, vitamin C 0mg·kg⁻¹ and β -Carotene 350mg·kg⁻¹; VC β C, vitamin C 150mg·kg⁻¹ and β -Carotene
 529 350mg·kg⁻¹.

530 ^d No Detectable.

531

532 Table 3. Vitamin C and β carotene effects on productive performance, GSH-Px activity and TBARS production (Exp.
 533 1).
 534

		TREATMENTS ^a				
535	Variable ^b	CON	VC	β C	VC β C	SEM ^c
536	Initial weight, kg ^d	5.60	5.60	5.64	5.63	0.171
537						
538						
539	Day 1 to 10 Feed intake, kg-d ⁻¹	0.23	0.22	0.22	0.23	0.004
540	Weight gain, kg-d ⁻¹	0.16	0.14	0.17	0.16	0.006
541	Gain/Feed, kg-d ⁻¹	0.71	0.66	0.77	0.69	0.020
542						
543	Day 11 to 24 Feed intake, kg-d ⁻¹	0.56	0.52	0.54	0.57	0.012
544	Weight gain, kg-d ⁻¹	0.40	0.38	0.39	0.41	0.011
545	Gain/Feed, kg-d ⁻¹	0.72	0.73	0.72	0.72	0.010
546						
547	Day 1 to 24 Feed intake, kg-d ⁻¹	0.40	0.37	0.38	0.40	0.008
548	Weight gain, kg-d ⁻¹	0.30	0.28	0.30	0.30	0.007
549	Gain/Feed, kg-d ⁻¹	0.77	0.76	0.78	0.76	0.010
550	Glutathione Peroxidase, μ mol of NADPH ^e					
551	Day 0	0.024	0.025	0.020	0.018	0.002
552	Day 12	0.022	0.013	0.021	0.014	0.003
553	Day 24	0.026	0.018	0.015	0.014	0.003
554						
555	Thiobarbituric Acid Reactive Species, nmol of TBARS ^{f,g}					
556	Day 0	0.023	0.027	0.018	0.029	0.003
557	Day 12	0.034	0.025	0.033	0.030	0.002
558	Day 24	0.028	0.025	0.025	0.022	0.001

559 ^a CON, vitamin C 0mg· kg⁻¹ and β-carotene 0mg· kg⁻¹ of the diet; VC, vitamin C 150 mg· kg⁻¹ and β-carotene 350 mg· kg⁻¹
560 ¹; βC, vitamin C 0mg· kg⁻¹ and β-carotene 350mg· kg⁻¹; VCβC, vitamin C 150mg· kg⁻¹ and β-carotene 350mg· kg⁻¹.

561 ^b P> 0.20, then no significant for major vitamin C or β-carotene effects.

562 ^c Standar Error of the Mean.

563 ^d P> 0.98, initial weight was not different between treatments.

564 ^e GSH-Px activity expressed as μmol NADPH oxidized/mg. of protein per minute. No differences (P>0.20) between
565 treatments after 24 days.

566 ^f Lipid peroxidation expressed as nmol of TBARS produced/mg of protein × 10⁻³. No differences (P<0.18) between
567 treatments after 24 days.

568 ^g Standard error of the mean (SEM), for TBARS production expressed as SEM × 10⁻³

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587 Table 4. Vitamin C and β -carotene effects on productive performance (Exp. 2).

588

589 TREATMENTS^a

590

591	Variable	CON	VC	β C	VC β C	SEM ^c
592	Initial weight, kg ^b	5.80	5.77	5.75	5.84	0.275
593	Day 1 to 10	Feed intake, kg·d ⁻¹	0.18	0.15	0.15	0.17
594			0.08	0.08	0.07	0.08
595			0.23	0.20	0.20	0.22
596	Day 11 to 20	Feed intake, kg·d ^{-1d}	0.40	0.35	0.38	0.41
597			0.24	0.24	0.25	0.28
598			0.60	0.68	0.69	0.68
599	Day 1 to 20	Feed intake, kg·d ^{-1d}	0.29	0.25	0.26	0.29
600			0.16	0.16	0.16	0.18
601			0.56	0.64	0.63	0.63
602						
603						
604						
605						

606 ^a CON, vitamin C 0mg·kg⁻¹ and β -carotene 0mg·kg⁻¹ of the diet; VC, vitamin C 150 mg·kg⁻¹ and β -carotene 350 mg·kg⁻¹

607 ¹; β C, vitamin C 0mg·kg⁻¹ and β -carotene 350mg·kg⁻¹; VC β C, vitamin C 150mg·kg⁻¹ and β -carotene 350mg·kg⁻¹.

608 ^b Initial weight was not different between treatments ($P > 0.99$).

609 ^c Standard Error of the Mean.

610 ^d Interaction effects ($P < 0.05$).

611 ^e β -Carotene major effects ($P < 0.05$).

612

7.9. References

613

614

615 AOAC International. 2000. Official methods of Analysis. Association of Official
616 Analytical Chemists. (17th Ed.) William Horowitz (Ed.) Arlington, V.A. Vol II, (41)
617 pp12.

618

619 Arrieta A.J., Díaz C.A., Avila G.E., Guinzberg P.R., Piña G.E. 1999. Daño oxidativo
620 pulmonar del Síndrome ascítico en pollos de engorda con dosis altas de vitaminas
621 E y C. *Téc. Pecu. Méx.* 37, (2) 47-55.

622

623 Bazinet R.P., McMillan E.G., Seebarsingh R., Hayes A.M., Cunnane S.C. 2003.
624 Whole-body β -oxidation of 18:2 ω 6 and 18:3 ω 3 in the pig varies markedly with
625 weaning strategy and dietary 18:3 ω 3. *J. Lipid Res.* 44: 314-319.

626

627 Böhm F., Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G. 1998. β -carotene with vitamins E
628 and C offers synergistic cell protection against NO_x. *FEBS Letters.* 436, 387-389.

629

630 Burton G.W., 1989. Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.* 119, 109-111.

631

632 Ching S., Mahan D.C., Ottobre J.S., Dabrowski K. 2001a. Ascorbic acid synthesis
633 in fetal and neonatal pigs and in pregnant and postpartum sows. *J. Nutr.* 131,
634 1997-2001.

635

636 Ching S., Mahan D.C., Dabrowski K. 2001b. Liver L-Gulonolactone oxidase activity
637 and tissue ascorbic acid concentration in nursing pigs and the effect of various
638 weaning ages. J. Nutr. 131, 2002-2006.

639

640 Darroch C.S. 2001. Vitamin A in swine nutrition. In: Lewis A.J., and Southern L.L.
641 (Eds), Swine nutrition. CRC, Press, Florida. pp 263-280.

642

643 de Rodas B.Z., Maxwell C.V., Davls M.E., Mandall S., Broekman E., Stoecker B.J.
644 1998. L-ascorbyl-2-polyphosphate as a vitamin C source for segregated and
645 conventionally weaned pigs. J. Anim. Sci. 76, 1636-1643.

646

647 de Rouchey J.M., Hancock J.D., Hines R.H., Maloney C.A., Lee D.J., Cao H., Dean
648 D.W., Park J.S. 2004. Effects of rancidity and free fatty acids in choice white
649 grease on growth performance and nutrient digestibility in weanling pigs. J. Anim.
650 Sci. 82, 2937-2944.

651

652 Dibner J.J., Atwell C.A., Kitchell M.L., Shermer W.D., Ivey F.J. 1996. Feeding of
653 oxidized fats to broilers and swine: effects on enterocyte turnover, hepatocyte
654 proliferation and the gut associated lymphoid tissue. Anim. Feed Sci. Technol. 62,
655 1-13.

656

657 Doba T., Burton G.W., Ingold K.U. 1985. Antioxidant and co-antioxidant activity of
658 vitamin C either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E

659 analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipids
660 liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 835, 298-303.

661 Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol.*
662 *Rev.* 82, 47-95.

663

664 Innis S.M. and Dyer R.A. 1999. Dietary canola oil alters hematological indices and
665 blood lipids in neonatal piglets formula. *J. Nutr.* 129, 1261-1268.

666

667 Kim Y.Y. and Mahan D.C. 2001. Comparative effects of high dietary levels of
668 organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. *J.*
669 *Anim. Sci.* 79, 942-948.

670

671 Kraus A., Roth H.P., Kirchgessner M. 1997. Supplementation with vitamin C,
672 vitamin E or β -carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of
673 Erythrocyte of Zinc-deficient rats. *J. Nutr.* 127, 1290-1296.

674

675 Lauridsen C., Højgaard S., Sørensen M.T. 1999. Influence of dietary rapeseed oil,
676 vitamin E and copper on the performance and the antioxidative and oxidative
677 status of pigs. *J. Anim. Sc.* 77, 906-916.

678

679 Lawrence R.A. and Burk R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium
680 deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, (4) 952-958.

681

682 Lei X.G., Dann H.M., Ross D.A. Cheng W.H. 1998. Dietary selenium
683 supplementation is required to support full expression of three selenium dependent
684 glutathione peroxidases in various tissues of weanling pigs. J. Nutr. 128, 130-135.

685 Leskanich C.O., Matthews K.R., Warkup C.C., Noble R.C., Hazzledine M. 1997.
686 The effect of dietary oil containing (n-3) fatty acids on the fatty acid,
687 physicochemical and organoleptic characteristics of pig meat and fat. J. Anim. Sci.
688 75, 673-683.

689

690 López Bote C.J., Isabel B., Flores J.M. 2001. Effect of dietary linoleic acid
691 concentration and vitamin E supplementation on cell desquamation and
692 susceptibility to oxidative damage of pig jejunal mucosa. J. Anim. Physiol. a. Anim.
693 Nutr. 85, 22-28.

694

695 Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1990. Quantification of
696 protein. In: Deutscher M.P. (Ed.) Guide to protein purification, methods in
697 Enzymology. Vol. 182. Academic Press. 57-60.

698

699 Mahan D.C. 2000. Effect of inorganic and inorganic selenium sources and levels
700 on sow colostrum and milk selenium content. J. Anim. Sci. 78, 100-105.

701

702 Mahan D.C. and Kim Y.Y. 1996. Effect of inorganic or organic selenium at two
703 dietary levels on reproductive performance and tissue selenium concentrations in
704 first parity gilts and their progeny. J. Anim. Sci. 74, 2711-2718.

705

706 Mahan D.C. and Parret N.A. 1996. Evaluating the efficacy of selenium enriched
707 yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione
708 peroxidase activity in grower and finisher swine. *J. Anim Sci.* 74, 2967-2974.

709

710 Mahan D.C. and Peters J.C., 2004. Long-term effects of dietary organic and
711 inorganic selenium sources and levels on reproducing sows and their progeny. *J.*
712 *Anim. Sci.* 82, 1343-1358.

713

714 Mahan D.C., Lepine A.J., Dabrowski K. 1994. Efficacy of Magnesium-L-Ascorbyl-2-
715 Phosphate as a vitamin C source for weanling and growing-finishing swine. *J.*
716 *Anim. Sci.* 72, 2354-2361.

717

718 Mahan D.C., Cline T.R., Richert B. 1999. Effects of dietary levels of selenium
719 enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing
720 pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity
721 carcass characteristics and loin quality. *J. Anim. Sci.* 77, 2172-2179.

722

723 Morgan C.A., Nielsen B.L., Lawrence A.B., Mendl M.T. 1999. Describing the social
724 environment and its effects on food intake and growth. In: Kyriazakis I. (Ed). *A*
725 *quantitative Biology of the pig.* CAB International. pp 99-123.

726

727 Nagy E.S., Huang M.C., Diau G.Y., Kirwan R., Chao A.C., Tschanz C., Brenna J.T.
728 2003. Long chain polyunsaturate supplementation does not induce excess lipid
729 peroxidation of piglets tissues. Eur. J. Nutr. 42, 293-296.
730
731 Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999. 1999. Especificaciones técnicas
732 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Diario Oficial de la
733 Federación.
734
735 NRC. 1998. Nutrient Requirements of swine. (10th Ed.) National Academy Press,
736 Washington DC.
737
738 Pion S.J., van Heugten E., See M.T., Larick D.K., Pardue S. 2004. Effects of
739 vitamin C supplementation on plasma ascorbic acid and oxalate concentrations
740 and meat quality in swine. J. Anim. Sci. 82, 2004-2012.
741
742 Reis de Souza T.C. and Mariscal L.G. 1997. El Destete, la función digestiva y la
743 digestibilidad de los alimentos en cerdos jóvenes. Téc. Pecu. Méx. 35, (3)145-158.
744
745 Rey A., López Bote C., Rloperoz J., Sanz G.M. 1996. Effect of dietary fat and α -
746 tocopherol administration on the susceptibility to oxidative damage of rabbit jejunal
747 mucosa. J. Anim. Physiol. a. Anlm. Nutr. 75, 242-249.
748

749 SAS Institute Inc. 1989 SAS/STAT User's Guide, version 6th Ed. SAS Institute Inc.,
750 Cary, N.C.
751
752 Steel G.D. R. and Torrie J.H. 1960. Principles and Procedures of Statistics.
753 McGraw-Hill, USA. pp. 132.
754
755 Thies F., Peterson L.D., Powell J.R., Nebe-von-Caron G., Hurst T.L., Matthwes
756 K.R., Newsholme E.A., Calder P.C. 1999. Manipulation of the type of fat consumed
757 by growing pigs affects plasma and mononuclear cell fatty acid compositions and
758 lymphocyte and phagocyte functions. J. Anim. Sci. 77: 137-147.
759
760 Tsuchihashi H., Kigoshi M., Iwatsuki M., Niki E. 1995. Action of β -carotene as an
761 antioxidant against lipid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics.
762 323, (1) 137-147.
763
764 Uchiyama M. and Mihara M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in
765 tissues by Thioarbituric Acid test. Analytical Biochemistry. 86, 271-278.
766
767 Wander R.C., Hall J.A., Gradin J.L., Du S.H., Jewell D.E. 1997. The Ratio of
768 Dietary (n-6) to (n-3) Fatty acids influences immune system function, eicosanoid
769 metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged Dogs. J. Nutr. 127,
770 1198-1205.
771

- 772 Wellenreiter R.H., Ullrey D.E., Miller E.R., Magee W.T. 1969. Vitamin A activity of
773 corn carotenes for swine. J. Nutr. 99, 129-136.
774
- 775 Willson, R.L. 1987. Vitamin, selenium, zinc and copper interactions in free radical
776 protection against ill-placed iron. Symposium on: Nutritional aspects of free
777 radicals. Proceedings of the Nutrition Society. 46, 27-34.
778
- 779 Yen J.T. and Pond W.G. 1981. Effect of dietary vitamin C addition on performance,
780 plasma vitamin C and hematic iron status in weanling pigs. J. Anim. Sci. 53, (5)
781 1292-1296.
782
- 783 Yen J.T. and Pond W.G. 1983. Response of swine to periparturient vitamin C
784 supplementation. J. Anim. Sci. 56, (3) 621-624.
785
- 786 Yen J.T. and Pond W.G. 1984. Response of weanling pigs to dietary
787 supplementation with vitamin C and carbadox. J. Anim. Sci. 58, (1) 132-137.

8. DISCUSIÓN

8.1. COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO

El uso de fuentes energéticas en proceso de oxidación, confirmadas por los niveles de peróxidos en el aceite de canola de $7.98 \text{ meq} \cdot \text{kg}^{-1}$ y $17.21 \text{ meq} \cdot \text{kg}^{-1}$ para sebo, en dietas de lechones al destete, no afectó el consumo diario de alimento (CDA), ganancia diaria de peso (GDP) o la eficiencia alimenticia (EA) en nuestros experimentos. Estos resultados, coinciden con los obtenidos por varios autores, desde lechones alimentados al nacimiento hasta los 18 días de edad, alimentados con dietas al 2.6% de aceite de canola (Innis S.M. y Dyer R.A., 1999), hasta cerdos en crecimiento y finalización (Leskanich *et al.* 1997) sin efectos positivos en la GDP. En este último trabajo, la EA se vio favorecida cuando el aceite de canola se usó al 2%. Cuando la fuente de energía usada fue sebo (Exp. 2), los resultados disienten de aquellos reportados por De Rouche *et al.* (2004) en lechones destetados a 21 días y alimentados con la misma fuente de energía, durante 35 días, quienes encontraron una disminución en el CDA ($P < 0.04$) con una respuesta lineal negativa al incremento de $\text{meq} \cdot \text{kg}^{-1}$ (a partir de 40 y hasta $105 \text{ meq} \cdot \text{kg}^{-1}$) desde los 7 días posdestete ($P < 0.001$), mientras que la EA fue menor que para el control ($P < 0.04$). Los índices de peróxidos encontrados en los ingredientes del presente estudio, no tuvieron impacto en el CDA, principalmente, porque nunca alcanzaron o sobrepasaron los $40 \text{ meq} \cdot \text{kg}^{-1}$, el nivel de peróxidos en las fuentes de energía pudo ser diluida con el resto de ingredientes en la dieta y por último por la presencia de otros nutrientes con actividad antioxidante; lo anterior podría explicar, por que no hubo repercusión en GDP o EA.

Los resultados de ambos experimentos indican que la inclusión de la vitamina C y β -caroteno, no influyó en los criterios de respuesta productiva en lechones destetados a edades tempranas (21 a 28 días de vida), aun y cuando para el Exp. 2 el CDA fue igual para los tratamientos control y la inclusión de ambos

compuestos, comparado con la suplementación de los animales con vitamina C o β -caroteno por separado a los 20 días posdestete, sin presentarse consecuencias en GDP o EA. Lo anterior concuerda con los resultados observados por Yen y Pond, (1983, 1984), en lechones lactantes y al destete, en donde el efecto más relevante, fue la concentración de vitamina C en plasma, ya que CDA, GDP y EA, no sufrieron alteraciones durante el periodo de inclusión, excepto cuando se adicionó la dieta con Carbadox. Otros autores (Arrieta *et al.* 1999) no reportaron efectos positivos en el comportamiento productivo, cuando se adicionó vitamina C en dosis de 400 ppm, en dietas para pollos durante los periodos de crecimiento y finalización. Sin embargo, otros autores (Yen y Pond, 1981; Mahan *et al.*, 1994), observaron efectos positivos en GDP y CDA, durante las primeras dos semanas posdestete. De Rodas *et al.* (1998) encontraron efectos para los mismos criterios, en animales destetados a 14 y 21 días de edad, con una respuesta lineal ($P < 0.1$) a la adición de vitamina C (150 ppm) en GDP, durante un periodo de 42 días posdestete. La síntesis de vitamina C depende del aporte de glucosa así como de la expresión de la enzima L-gulono γ -lactona oxidasa hepática (GLO). A nivel fetal, la actividad de la GLO es alta hasta los 60 días de gestación, después hay una disminución en la expresión de la enzima, y la concentración de vitamina C en hígado durante la gestación tardía; también existe un aumento en la concentración de vitamina C en glándula mamaria, lo que podría sugerir la transferencia del ácido ascórbico a los lechones durante la lactancia (Ching *et al.* 2001a). Posiblemente el aporte de la vitamina en calostro y leche, suprime la actividad de la GLO a nivel hepático y por lo tanto la síntesis de la vitamina C, disminuyendo la concentración del ácido ascórbico circulante y en tejidos, hasta 2 semanas posdestete, que es cuando se da la expresión de la enzima (Yen y Pond, 1983; Ching *et al.* 2001b).

Yen y Pond (1981) encontraron una respuesta lineal positiva a la adición de vitamina C, en la concentración de ácido ascórbico a nivel plasmático y en consecuencia hubo una disminución de Fe. Esto podría explicar el menor estrés al

que fueron sometidos los animales provocado por la presencia de los pro-oxidantes (Fe), cuando se adicionó L-ácido ascórbico y por lo tanto hubo una mayor expresión del consumo y ganancia de peso. Mahan *et al.* (1994) no reportaron diferencias en la concentración plasmática de vitamina C, en animales de más de 55 kg, aun y cuando la concentración en hígado tiende a incrementarse.

La Información generada con el uso de β -caroteno en cerdos se limita a los trabajos realizados en cerdas y sus efectos en la reproducción. Los efectos observados por Chew (1993) en cerdas y por Weng *et al.* (2000) en perras, son la mayor tasa de crecimiento fetal, menor reabsorción embrionaria, disminución de nacidos muertos, lo cual se ve reflejado en camadas de mayor tamaño y peso al nacimiento y destete. Las posibles explicaciones para estos efectos van desde cambios en las secreciones uterinas y aumento en la producción de progesterona, hasta un potencial antioxidante del β -caroteno protegiendo a las células contra las especies reactivas al oxígeno, bajo condiciones de estrés y que dan estabilidad al micro-ambiente de ciertos tejidos como el endometrio uterino (Weng *et al.* 2000).

Los resultados obtenidos en este ensayo, en donde la inclusión de la pro-vitamina no favoreció CDA, GDP o EA, discrepan de los encontrados por Wellenreiter *et al.* (1969), cuando se incluyeron grano y gluten de maíz (altas en carotenoides), en dietas de cerdos desde el destete (35 días de edad), hasta el periodo de crecimiento y finalización, y en donde existieron mejores GDP respecto a las dietas básicas, acompañado de una mayor concentración sérica y hepática de vitamina A, lo que sugiere que la mayor proporción de la pro-vitamina proveniente del maíz fue convertida y no absorbida como carotenoides.

Kraus *et al.* (1997) tuvieron una respuesta negativa en GDP, cuando adicionaron la vitamina E, vitamina C y β -caroteno como antioxidantes, en ratas alimentadas con dietas deficientes en Zinc (Zn), en donde la mejor respuesta para la variable

fue la de los animales con niveles adecuados de Zn sin antioxidantes suplementados. Por lo anterior, la adición de antioxidantes naturales en la dieta de los animales domésticos va encaminada al mantenimiento de procesos vitales, participando de forma importante como cofactores elementales en enzimas, o manteniendo la integridad de membrana en tejidos y por lo cual no necesariamente se verá reflejado en el comportamiento productivo.

La respuesta productiva de los animales a los tratamientos, pareció ser más efectiva en el segundo experimento, probablemente por que los lechones no recibieron alimento durante la lactancia y por que las condiciones impuestas en la formulación de la dieta experimental, sin el uso de antibióticos, hizo más evidentes los efectos. Sin embargo, al término del periodo experimental, el comportamiento productivo de los lechones fue mejor en el Exp. 1.

8.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (GSH Px)

La actividad enzimática de la Glutathiona peroxidasa (GSH Px) durante el experimento, no presentó diferencias entre tratamientos. Lo anterior, conviene con lo observado por Mahan *et al.* (1994) en donde no existió respuesta en la actividad de la GSH Px a través del tiempo (35 días) en animales recién destetados, así como para crecimiento y finalización, cuando se adicionó a la dieta hasta 500 ppm de ácido ascórbico. La misma respuesta se advirtió en ratas (Kraus *et al.*, 1997) suplementadas con ácido ascórbico, β -caroteno y vitamina E, en dietas deficientes de Zinc (Zn). Esto sugiere que la diversificación de algunos nutrientes esenciales en la actividad de la enzima, como el Se, no se vio favorecida al incluir en la dieta la vitamina C, β -caroteno o ambas. Al existir transferencia de Se de la madre a los lechones, el estatus de este mineral en la prole es adecuado para satisfacer las demandas, además existe un incremento en la actividad de la enzima a partir de los 7 días de edad. El aporte del mineral de la madre a los lechones, comienza en la gestación tardía lo cual coincide con un decremento lineal a partir de los 70

días de gestación en los niveles de Se tisular de la madre (Mahan y Peters, 2004). Esto podría explicar, por que en nuestros resultados, la actividad de la enzima fue constante para todos los tratamientos, ya que las fuentes de Se en los lechones pudieron ser suficientes para solventar una situación de estrés oxidativo al parto y durante la lactancia, lo cual asociado a la acción antioxidante de otras enzimas, como la superóxido dismutasa pudieron encubrir los efectos de la vitamina C y β -caroteno. La función del Se en los lechones, no se limita a la expresión de GSH Px, también es retenido en gran cantidad de tejidos en forma de seleno-aminoácidos (principalmente seleno-metionina), y que no son requeridos salvo en estados catabólicos específicos de los tejidos (Mahan y Kim, 1996; Mahan, 2000; Mahan y Parret, 1996).

Lei *et al.*, (1998) observó que la actividad enzimática en plasma de lechones destetados a 28 días fue diferente cuando se adicionó Se de 0 a 0.3 mg/kg de alimento. La inclusión del Se según las recomendaciones del NRC (1998) en nuestras dietas experimentales, podría explicar el por que no hubo diferencias entre tratamientos, permitiendo la expresión y el funcionamiento de la GSH Px.

Las tendencias de los tratamientos, a través del tiempo (24 días), no fueron significativas, lo cual contrasta con lo observado por otros autores (Mahan y Parret, 1996); Mahan *et al.*, 1999), en donde la actividad de la enzima tuvo una respuesta cuadrática al adicionar dos fuentes de Se para el periodo de crecimiento y finalización con concentraciones de 0.05 y 0.5 ppm en la dieta; Kim y Mahan (2001) observaron el incremento numérico de las unidades de GSH Px en animales entre 3 y 12 semanas de edad, cuando la inclusión del mineral alcanzó niveles de toxicidad (hasta 20 ppm de Se). Probablemente, los niveles superiores de vitamina C y/o β -caroteno no fueron tan importantes en la remoción de radicales libres, y la fuente de estrés no fue tan severa, como para verse reflejado en la actividad de la GSH Px.

8.3. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (TBARS)

La inclusión de aceite de canola al 5% en dietas de lechones suplementados con vitamina C o β -caroteno, no afectó los niveles plasmáticos de TBARS, hallazgos que coinciden con los resultados de Nagy *et al.* (2003) cuando se favorecieron ácidos grasos polinsaturados de cadena larga sin observar niveles altos de TBARS en plasma, no así cuando se evaluaron estas especies a nivel hepático y de eritrocitos, en donde la fracción lipídica asociada a membrana celular fue más susceptible al daño oxidativo. Los niveles de otros agentes antioxidantes usados en nuestro experimento, como el α -tocoferol, pudieron ser fundamentales en la protección de las fracciones lipídicas circulantes, sin embargo no existieron parámetros de evaluación en la fracción lipídica de membranas que pudiera demostrar los posibles efectos en la protección de los PUFA por parte del β -caroteno, dada su afinidad a la porción lipídica. Nuestros resultados también difieren a lo encontrado en otros tejidos (Leskanich *et al.* 1997), como en el músculo *longissimus dorsi*, en cerdos de crecimiento y finalización al ser incluido aceite de canola al 2%, los cuales fueron más propensos a la producción de TBARS, favorecido por la presencia de ácidos grasos mono y polinsaturados (18:1 y 18:2, principalmente), aun y cuando la grasa dorsal no presentó diferencias en la producción de estos subproductos. Otros autores (Rey A., *et al.* 1996; López Bote *et al.*, 2001) encontraron mayor cantidad de TBARS en mucosa intestinal de conejos y cerdos, respectivamente, cuando se indujo daño oxidativo en esos tejidos y los animales fueron alimentados con dietas, en donde las fuente de energía fue de origen vegetal. La similitud entre los niveles de TBARS en nuestros resultados a lo largo del tiempo, podrían deberse a la suplementación de niveles de vitamina E en las dietas, y que fueron superiores a aquellos recomendados por el NRC (1998); estos niveles pudieron ser suficientes para eliminar los peróxidos originados de la dieta o formados en los tejidos, tal y como lo reporta López Bote *et al.* (2001), cuando suplementó vitamina E a los animales en finalización. Posiblemente, los peróxidos provenientes de la dieta, al ser transportados vía

quilomicrones junto con la vitamina E y el β -Caroteno, son inactivados antes de provocar el proceso de oxidación de fracciones lipídicas, por lo que no fue posible detectar su presencia en plasma.

Los niveles de TBARS encontrados en plasma de lechones indican que no hubo actividad antioxidante que favoreciera la remoción de subproductos de la oxidación por actividad de la vitamina C, lo cual concuerda con lo observado por Pion, *et al.* (2004), en chuletas de cerdos suplementados durante el periodo de finalización con 1,000 a 2,000 mg de ácido ascórbico en el agua de bebida y en donde se evaluó el poder antioxidante de la vitamina en chuletas. Los niveles de TBARS en tejido pulmonar de pollos, se redujeron de forma importante, cuando la vitamina E y C fueron incluidas a las dietas, principalmente en aquellos periodos productivos en donde los animales fueron más susceptibles al estrés oxidativo (Arrieta *et al.* 1999). Lo mismo sucedió cuando se alimentaron ratas (Kraus *et al.* 1997) con dietas deficientes en Zinc (Zn) pero suplementadas con vitamina E (300 ppm), vitamina C (650 ppm) y β -caroteno (70 ppm), reduciendo notablemente la producción de TBARS en eritrocito por la inclusión de α -tocoferol y del β -caroteno. El efecto de los antioxidantes podrían ser más claros en pulmón y eritrocito por la mayor presión de oxígeno en estos tejidos, la cual hace más factible un proceso de oxidación en la fracción lipídica, especialmente aquellos con afinidad por esta porción de las membranas; mientras que la vitamina C al ser un compuesto hidrofílico, podría tener un efecto sinérgico, regenerando la molécula del β -caroteno cuando este ha sido oxidado, como se ha comprobado a nivel celular (Böhm *et al.* 1998), y tal como sucede con la vitamina E. Cuando Yeum *et al.* (2003) midieron la tasa de desaparición de antioxidantes en plasma humano, se observó que la función de estos también está ligada al tipo de radical libre en la porción plasmática (lipídica o acuosa) siendo los más eficientes α -tocoferol y ácido ascórbico respectivamente.

9. Literatura Citada

- Arrieta A.J., Díaz C.A., Avila G.E., Guinzberg P.R., Piña G.E. 1999. Daño oxidativo pulmonar del síndrome ascítico en pollos de engorda con dosis altas de vitaminas E y C. *Téc. Pecu. Méx.* 37, (2) 47-55.
- Aurousseau B. 2002. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim.* 15, (1) 67-82.
- Bachmann H., Desbarats A., Pattison P., Sedgewick M., Riss G., Wyss A., Cardinault N., Duszka C., Goralczyk R., Grolier P. 2002. Feedback regulation of β,β -carotene 15,15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. *J. Nutr.* 132, 3616-3622.
- Blakely S.r., Mitchell G.V., Jenkins M.Y., Grundel E., Whittaker P. 1991. Canthaxanthin and excess vitamin A alter α -tocopherol, carotenoid and iron status in adult rats. *J. Nutr.* 121: 1649-1655.
- Böhm F., Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G. 1998. β -carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NO_x . *FEBS Letters.* 436, 387-389.
- Borel P., Tyssandier V., Mekki N., Grolier P., Rochette Y., Alexandre-Gouabau M.C., Lalron D., Azais-Braesco V. 1998. Chylomicron β -carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest β -carotene with medium-chain rather than long chain triglycerides. *J. Nutr.* 128. 1361-1367.
- Burton G.W. and Ingold K.U. 1984. β -carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science.* 224, 569-573.

Burton G.W., 1989. Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.* 119, 109-111.

Chew B.P. 1993. Effects of supplemental β -carotene and vitamin A on reproduction in swine. *J. Anim. Sci.* 71, 247-252.

Chew B.P. 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. Conference: Beyond deficiency: New views of vitamins in ruminant nutrition and health. *J. Nutr.* 125: 1804S-1808S.

Ching S., Mahan D.C., Ottobre J.S., Dabrowski K. 2001a. Ascorbic acid synthesis in fetal and neonatal pigs and in pregnant and postpartum sows. *J. Nutr.* 131, 1997-2001.

Ching S., Mahan D.C., Dabrowski K. 2001b. Liver L-Gulonolactone oxidase activity and tissue ascorbic acid concentration in nursing pigs and the effect of various weaning ages. *J. Nutr.* 131, 2002-2006.

Ching S., Mahan D.C., Wiseman T.G., Fastinger N.D. 2002. Evaluating the antioxidant status of weanling pigs fed dietary vitamins A and E. *J. Anim. Sci.* 80, 2396-2401.

Darroch C.S. 2001. Vitamin A in swine nutrition. In: Lewis A.J., and Southern L.L. (Eds), *Swine nutrition*. CRC, Press, Florida. pp 263-280.

de Rodas B.Z., Maxwell C.V., Davis M.E., Mandall S., Broekman E., Stoecker B.J. 1998. L-ascorbyl-2-polyphosphate as a vitamin C source for segregated and conventionally weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 76, 1636-1643.

de Rouchey J.M., Hancock J.D., Hines R.H., Maloney C.A., Lee D.J., Cao H., Dean D.W., Park J.S. 2004. Effects of rancidity and free fatty acids in choice white

grease on growth performance and nutrient digestibility in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 82, 2937-2944.

Dibner J.J., Atwell C.A., Kitchell M.L., Shermer W.D., Ivey F.J. 1996. Feeding of oxidized fats to broilers and swine: effects on enterocyte turnover, hepatocyte proliferation and the gut associated lymphoid tissue. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62, 1-13.

Doba T., Burton G.W., Ingold K.U. 1985. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 835, 298-303.

Dove and Cook. 2001. Water-soluble vitamins in swine nutrition. In: Lewis A.J., and Southern L.L. (Eds), *Swine nutrition*. CRC, Press, Florida. pp 315-355.

Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.

Gessler N.N., Gomboeva S.B., Shumaev K.B., Bykhovskii V.Y., Lankin V.Z. 2001. Free radical lipid peroxidation inhibits enzymatic conversion of β -carotene into vitamin A. *Bull. Of Exp. Biol. and Med.* 131, (5) 451-453.

Halliwell B. 1987. Free radicals and metal ions in health and disease. Symposium on: Nutritional aspects of free radicals. *Proceedings of the Nutrition Society.* 46, 13-26.

Innis S.M. and Dyer R.A. 1999. Dietary canola oil alters hematological indices and blood lipids in neonatal piglets formula. *J. Nutr.* 129, 1261-1268.

Jackson M.J. 1987. Muscle damage during exercise: possible role of free radicals and protective effect of vitamin E. Symposium on: Nutritional aspects of free radicals. Proceedings of the Nutrition Society. 46, 77-80.

Kim Y.Y. and Mahan D.C. 2001. Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 79, 942-948.

Kraus A., Roth H.P., Kirchgessner M. 1997. Supplementation with vitamin C, vitamin E or β -carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of Erythrocyte of Zinc-deficient rats. J. Nutr. 127, 1290-1296.

Lauridsen C., Højgaard S., Sørensen M.T. 1999. Influence of dietary rapeseed oil, vitamin E and copper on the performance and the antioxidative and oxidative status of pigs. J. Anim. Sci. 77, 906-916.

Lawrence R.A. and Burk R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, (4) 952-958.

Lei X.G., Dann H.M., Ross D.A. Cheng W.H. 1998. Dietary selenium supplementation is required to support full expression of three selenium dependent glutathione peroxidases in various tissues of weanling pigs. J. Nutr. 128, 130-135.

Leskanich C.O., Matthews K.R., Warkup C.C., Noble R.C., Hazzledine M. 1997. The effect of dietary oil containing (n-3) fatty acids on the fatty acid, physicochemical and organoleptic characteristics of pig meat and fat. J. Anim. Sci. 75, 673-683.

López Bote C.J., Isabel B., Flores J.M. 2001. Effect of dietary linoleic acid concentration and vitamin E supplementation on cell desquamation and

susceptibility to oxidative damage of pig jejunal mucosa. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 85, 22-28.

Mahan D.C. 2000. Effect of inorganic and organic selenium sources and levels on sow colostrum and milk selenium content. *J. Anim. Sci.* 78, 100-105.

Mahan D.C. 2001. Selenium and Vitamin E in swine nutrition. In: Lewis A.J., and Southern L.L. (Eds), *Swine nutrition*. CRC, Press, Florida. pp 281-314.

Mahan D.C. and Kim Y.Y. 1996. Effect of inorganic or organic selenium at two dietary levels on reproductive performance and tissue selenium concentrations in first parity gilts and their progeny. *J. Anim. Sci.* 74, 2711-2718.

Mahan D.C. and Parret N.A. 1996. Evaluating the efficacy of selenium enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. *J. Anim. Sci.* 74, 2967-2974.

Mahan D.C. and Vallet J.L. 1997. Vitamin and mineral transfer during fetal development and the early postnatal period in pigs. *J. Anim. Sci.* 75, 2731-2738.

Mahan D.C. and Peters J.C., 2004. Long-term effects of dietary organic and inorganic selenium sources and levels on reproducing sows and their progeny. *J. Anim. Sci.* 82, 1343-1358.

Mahan D.C., Lepline A.J., Dabrowski K. 1994. Efficacy of Magnesium-L-Ascorbyl-2-Phosphate as a vitamin C source for weanling and growing-finishing swine. *J. Anim. Sci.* 72, 2354-2361.

Mahan D.C., Cline T.R., Richert B. 1999. Effects of dietary levels of selenium enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing

pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity carcass characteristics and loin quality. J. Anim. Sci. 77, 2172-2179.

Mahan D.C., Kim Y.Y., Stuart R.L. 2000. Effect of vitamin E sources (RRR-or all-*rac*- α -tocopheryl acetate) and levels on sow reproductive performance, serum, tissue, and milk α -tocopherol contents over a five parity period, and the effects on the progeny. J. Anim. Sci. 78, 110-119.

Maki P.A. and Newberne P.M. 1992. Dietary lipids and immune function. Symposium on: History of nutritional Immunology. J. Nutr. 122, 610-614.

Mayes P.A. 1996. Metabolismo de los ácidos grasos insaturados y de los eicosanoides. En: Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. (Ed) *Bloquímica de Harper*. Apple and Lange. pp 279-288.

Miller J.K., Brzezinska-Slebodzinska E. 1993. Oxidative stress, Antioxidants, and animal function. J. Dairy Sci. 76, 2812-2823.

Moreira I. And Mahan D.C. 2002. Effect of dietary levels of vitamin E (all-*rac*-tocopheryl acetate) with or without added fat on weanling pig performance and tissue α -tocopherol concentration. J. Anim. Sci. 80, 663-669.

Morgan C.A., Nielsen B.L., Lawrence A.B., Mendl M.T. 1999. Describing the social environment and its effects on food intake and growth. In: Kyriazakis I. (Ed). *A quantitative Biology of the pig*. CAB International. pp 99-123.

Myer R.O., Lamkey J.W., Walker W.R., Brendemuhl J.H., Combs G.E. 1992. Performance and carcass characteristics of swine when fed diets containing canola oil and added copper to alter the unsaturated:saturated ratio of pork fat. J. Anim. Sci. 70, 1417-1423.

Nagy E.S., Huang M.C., Dlau G.Y., Kirwan R., Chao A.C., Tschanz C., Brenna J.T. 2003. Long chain polyunsaturate supplementation does not induce excess lipid peroxidation of piglets tissues. *Eur. J. Nutr.* 42, 293-296.

Napoli J.L., 1993. Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: Roles of CRBP and CRABP in retinoic acid: Roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. Symposium: Retinoids: Cellular metabolism and activation. *J. Nutr.* 123: 362-366.

North J.A., Spector A.A., Buettner G.R. 1994. Cell fatty acid composition affects free radical formation during lipid peroxidation. *Am. J. Physiol.* 267 (Cell Physiol. 36), C177-C188.

NRC. 1998. Nutrient Requirements of swine. (10th Ed.) National Academy Press, Washington DC.

Olson J.A. 1989. Provitamin A function of carotenoids: The conversion of β -carotene in to vitamin A. *J. Nutr.* 119, 105-108.

Ong D.E., 1993. Retinoid metabolism during intestinal absorption. Symposium: Retinoids: Cellular metabolism and activation. *J. Nutr.* 123: 351-355.

Pion S.J., van Heugten E., See M.T., Larick D.K., Pardue S. 2004. Effects of vitamin C supplementation on plasma ascorbic acid and oxalate concentrations and meat quality in swine. *J. Anim. Sci.* 82, 2004-2012.

Raharjo S. and Sofos J.N. 1993. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissue: A review. *Meat Science.* 35, 145-169.

Reis de Souza T.C. and Mariscal L.G. 1997. El Destete, la función digestiva y la digestibilidad de los alimentos en cerdos jóvenes. *Téc. Pecu. Méx.* 35, (3)145-158.

Rey A., López Bote C., Rioperez J., Sanz G.M. 1996. Effect of dietary fat and α -tocopherol administration on the susceptibility to oxidative damage of rabbit jejunal mucosa. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 75, 242-249.

Ross A.C., 1993. Overview of retinoid metabolism. Symposium: Retinoids: Cellular metabolism and activation. *J. Nutr.* 123: 346-350.

Salaway J.G. 1999. The pentose phosphate pathway and the production of $\text{NADPH}+\text{H}^+$. In: Blackwell (Ed). *Metabolism at a Glance*. Blackwell Science. 2nd Ed. pp. 32.

Schaefer D.M., Liu Q., Faustman C., Yin M.C. 1995. Supranutritional administration of vitamin E and C improves oxidative stability of beef. *J. Nutr.* 125, 1792S-1798S.

Slater T.F., Cheeseman K.H., Davies M.J., Proudfoot K., Xin W. 1987. Free radicals mechanisms in relation to tissue injury. Symposium on: Nutritional aspects of free radicals. *Proceedings of the Nutrition Society.* 46, 1-12.

Soler-Velasques M.P., Brendemuhl J.H., McDowell L.R., Sheppard K.A., Johnson D.D., Williams S.N. 1998. Effects of supplemental vitamin E and canola oil on tissue tocopherol and liver fatty acid profile of finishing swine. *J. Anim. Sci.* 76, 110-117.

Steinberg F.M., Chalt A. 1998. Antioxidants vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 319-327.

Sun F., Hayami S., Haruna S., Ogiri Y., Tanaka K., Yamada Y., Ikeda K., Yamada H., Sugimoto H., Kawai N., Kojo S. 2000. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamin C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *J. Agric. Food. Chem.* 48, 1462-1465.

Tsuchihashi H., Kigoshi M., Iwatsuki M., Niki E. 1995. Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 323, (1) 137-147.

Uchiyama M. and Mihara M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by Thio-barbituric Acid test. *Analytical Biochemistry.* 86, 271-278.

van den Berg H. 1999. Carotenoid interactions. *Nutrition Reviews.* 57, (1) 1-10.

van het Hof K.H. 2000. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J. Nutr.* 130, 503-506.

Wander R.C. 2001. Lipid oxidation in biological systems enriched with long chain n-3 fatty acids. In: Wildman E.C. (Ed). *Handbook of nutraceutical and functional foods.* CRC. pp. 305-329.

Wander R.C., Hall J.A., Gradin J.L., Du S.H., Jewell D.E. 1997. The Ratio of Dietary (n-6) to (n-3) Fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged Dogs. *J. Nutr.* 127, 1198-1205.

Wellenreiter R.H., Ullrey D.E., Miller E.R., Magee W.T. 1969. Vitamin A activity of corn carotenes for swine. *J. Nutr.* 99, 129-136.

Weng B.C., Chew B.P., Wong T.S., Park J.S., Kim H.W., Lepine A.J. 2000. β -carotene uptake and changes in ovarian esterooids and uterine proteins during the estrous cycle in the canine. *J. Anim. Sci.* 78, 1284-1290.

Willson, R.L. 1987. Vitamin, selenium, zinc and copper Interactions in free radical protection against ill-placed Iron. Symposium on: Nutritional aspects of free radicals. *Proceedings of the Nutrition Society.* 46, 27-34.

Yen J.T. and Pond W.G. 1981. Effect of dietary vitamin C addition on performance, plasma vitamin C and hematic Iron status in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 53, (5) 1292-1296.

Yen J.T. and Pond W.G. 1983. Response of swine to periparturient vitamin C supplementation. *J. Anim. Sci.* 56, (3) 621-624.

Yen J.T. and Pond W.G. 1984. Response of weanling pigs to dietary supplementation with vitamin C and carbadox. *J. Anim. Sci.* 58, (1) 132-137.

Yeum K.J., Aldini G., Chung H.Y., Krinsky N.I., Russell R.M. 2003. The activities of antioxidant nutrients in human plasma depend on the localization of attacking radical species. *J. Nutr.* 133, 2688-2691.