

USO DEL ANÁLISIS ISOTÓPICO DEL CARBONO Y DEL NITRÓGENO EN LA TRAZABILIDAD DE PRODUCTOS DERIVADOS DEL CERDO IBÉRICO

R. NIETO¹ Y J. F. AGUILERA^{1,2}

RESUMEN

La producción tradicional de cerdo Ibérico es un claro ejemplo de sistema extensivo de producción animal sostenible, respetuosa con el entorno, en la línea marcada por las tendencias actuales de la Política Agraria de los países de la Unión Europea. La pureza racial y la alimentación basada en la bellota, en la fase final de cebo durante la montanera en la dehesa mediterránea, son los dos principales factores que afectan a la calidad de los productos derivados de la industria del cerdo Ibérico. El alto valor económico que alcanzan los productos curados cuando proceden de animales producidos en las citadas condiciones hace necesaria la regulación e identificación de los productos que cumplen estos requisitos. Las relaciones isotópicas $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ y $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ determinadas en tejidos de cerdo Ibérico al sacrificio tienen cierto valor potencial como método de identificación y control del tipo de alimentación al que ha estado sometido el animal durante la fase final de cebo previa al sacrificio, es decir, constituyen una herramienta prometedora en la trazabilidad de materiales para diferenciar animales de bellota, recebo y cebo a pienso. Se analizan las variaciones en estas relaciones isotópicas debidas a los tres tipos de alimentación mencionados, en un trabajo de carácter preliminar realizado en colaboración con el Grupo de Bioquímica de Isótopos estables de la Estación Experimental del Zaidín.

Palabras clave: ^{15}N , ^{13}C , trazabilidad, cerdo Ibérico

¹ Instituto de Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Cno. del Jueves s/n, 18100 Armilla, Granada.

² Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

INTRODUCCIÓN

El sector porcino es el primero en importancia en la ganadería española. El valor económico de su producción anual excede los 4.000 millones de euros, lo que coloca a España como segundo productor de la Europa de los 25. Centrándonos en el cerdo Ibérico, su producción se ha revitalizado en los últimos años gracias a la apertura de los mercados comunitarios y de terceros países a sus productos y a la creciente demanda del propio mercado nacional de productos de elevada calidad, valor añadido y características organolépticas excelentes. De aquí que hayan de quedar garantizados al consumidor su origen y calidad. Actualmente los censos de porcino Ibérico alcanzan aproximadamente un 9-10% del porcino nacional. Andalucía ocupa una posición extraordinariamente importante como base territorial en la explotación del cerdo Ibérico. Según datos del MARM (2010), en diciembre de 2008 se encontraba en nuestra comunidad autónoma el 34% del porcino extensivo del censo nacional y es previsible un aumento de la cabaña porcina Ibérica en los próximos años, siguiendo la tendencia común a todo el territorio nacional, una vez se superen los problemas coyunturales causados por la limitada disponibilidad de materias primas y la crisis económica general.

Es suficientemente conocido que la producción de cerdo Ibérico está fuertemente unida al uso de la dehesa y que posiblemente esta íntima e interdependiente relación sea responsable de que este tipo de explotación haya sobrevivido a la enorme transformación que la producción porcina ha experimentado en las últimas décadas. En efecto, el cerdo Ibérico está muy bien adaptado a las condiciones ambientales y ecológicas de la dehesa. Presenta una gran capacidad para recorrer largas distancias y para seleccionar y consumir su principal recurso alimenticio: la bellota, el fruto de las especies del género *Quercus*, *Q. rotundifolia* (encina), *Q. suber* (alcornoque) y *Q. lusitanicus* (quejigo). De la dehesa el cerdo Ibérico obtiene también hierba, especialmente abundante en primavera, que le permite cubrir parte de sus necesidades energéticas y proteicas, y en menor cantidad también disponible durante el periodo que media entre los meses de octubre y marzo, la cual complementa a la bellota. La producción tradicional de cerdo Ibérico es un claro ejemplo de sistema extensivo de producción animal sostenible, no agresiva respecto a su entorno, que sigue la línea marcada por las tendencias actuales de la Política Agraria de los países de la Unión Europea. La pureza racial y la alimentación basada en la bellota, en la fase final de cebo durante la montanera en la dehesa mediterránea, son los dos pilares en que descansa la calidad inequívoca de los productos de la industria del cerdo Ibérico. El alto valor económico que alcanzan los productos curados cuando derivan de animales producidos en las citadas condiciones ha hecho necesaria la regulación e identificación de los produc-

tos que cumplen estos requisitos. En noviembre de 2007 el Boletín Oficial del Estado publicó el Real Decreto 1469/2007 que aprueba la Norma de Calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos. Recopila la normativa aparecida desde la publicación del RD 1083/2001 sobre esta materia. La norma clasifica los productos curados procedentes de cerdo Ibérico en cuatro categorías (designaciones de calidad), atendiendo al régimen de alimentación de los animales durante la fase final de cebo: a) *De bellota o terminado en montanera*, que requiere al menos 46 Kg de ganancia de peso y 60 días de estancia mínima en montanera y, por lo tanto, con alimentación basada en bellota y hierba, de animales de al menos diez meses de edad y peso medio comprendido entre 92 y 115 Kg a la entrada en montanera; b) *de recebo o terminado en recebo*, que difiere de la categoría anterior en que la ganancia de peso bajo alimentación con bellota debe conducir al menos a una reposición de 29 Kg; c) *de cebo de campo*, si se alimenta a los animales con alimentos o mezclas comerciales basadas en cereales y leguminosas, completan su acabado a pienso con una estancia en campo de al menos 60 días y se les sacrifica a una edad no inferior a los doce meses; y d) *de cebo*, para productos frescos o curados que proceden de cerdos criados a pienso y sacrificados con una edad mínima de diez meses. La normativa, aún con sus evidentes lagunas, presta especial atención al control y certificación de la calidad, el primero constituido por un sistema de autocontrol, establecido por los propios operadores (ganaderos, mataderos, transformadores, comercializadores, etc.) respecto a las operaciones que realicen bajo su responsabilidad, que se complementa mediante controles llevados a cabo por organismos independientes (laboratorios, para análisis de ácidos grasos y análisis genéticos; entidades de inspección y entidades de certificación), reconocidos por la Administración. El estudio isotópico que describimos está relacionado con la actividad a desarrollar por los laboratorios y pretende analizar la viabilidad del análisis isotópico como método de control de la calidad de los productos derivados del cerdo Ibérico, complementario o alternativo al oficial, basado en el perfil de ácidos grasos obtenido por cromatografía de gases (Porrás Tejeiro y col., 2009).

Nuestro grupo de investigación viene prestando especial atención al estudio de la nutrición del cerdo Ibérico y en particular, a la mejora del conocimiento de su metabolismo proteico y energético, con el objetivo general de contribuir a la optimización del uso de los recursos alimenticios y a la preservación y promoción del cerdo Ibérico como raza autóctona en el marco de un sistema sostenible de producción animal. Hemos dedicado un importante esfuerzo a la evaluación nutricional de los recursos disponibles en la dehesa, bellota y hierba, que constituyen la fuente exclusiva de nutrientes para el animal durante su periodo final de cebo en montanera, único que da origen a productos de la máxima calidad organoléptica (Nieto y col.,

2002b; García-Valverde y col., 2007). En estos trabajos hemos evaluado la bellota de encina no sólo como fuente energética, sino como el principal recurso que durante la montanera aporta proteína al animal. Las pruebas realizadas han permitido conocer la digestibilidad real de sus aminoácidos, medida en íleon terminal. El estudio del perfil de su contenido en aminoácidos digeribles sugiere desequilibrios importantes que limitan la deposición de proteína en el animal y penalizan la eficiencia de este proceso de síntesis neta. Así mismo, hemos llevado a cabo, integrados en diversos proyectos de investigación, estudios sobre la nutrición y metabolismo del cerdo Ibérico en distintas fases de su crecimiento-cebo previas a la entrada en montanera para conocer su capacidad de ingesta, la eficiencia de utilización digestiva y metabólica del alimento, particularmente de la proteína de la dieta, determinar la máxima tasa de deposición proteica, los efectos del plano de alimentación sobre la velocidad de deposición de proteína y energía en el animal y definir sus necesidades energéticas en términos de energía metabolizable para mantenimiento y crecimiento y las nitrogenadas en términos de proteína ideal. (Nieto y col., 2002a y 2003; Barea y col., 2006 y 2007). Las estimaciones de la ingestión voluntaria de alimento revelan en el cerdo Ibérico una capacidad de ingesta algo superior a las observadas en razas mejoradas (Nieto y col., 2001). Parece ser que, efectivamente, la selección para lograr mayores capacidades de retención proteica y canales menos grasas ha implicado una pérdida en capacidad de ingestión. Todos estos estudios han permitido estimar las necesidades energéticas y proteicas para el mantenimiento y el crecimiento-cebo. Trabajos adicionales (Rivera Ferre y col., 2005 y 2006; Fernández-Fígares y col., 2007) confirman importantes diferencias metabólicas en el proceso de la renovación proteica entre el cerdo Ibérico y los genotipos mejorados, tanto a nivel corporal total como en tejidos específicos que, junto a singularidades en perfil hormonal, ayudan a explicar las diferencias entre genotipos en deposición de proteína y en la eficiencia de utilización de la energía de la dieta para este proceso, constatadas a nivel práctico. Por otro lado, el gasto energético de la actividad física es un componente importante del gasto energético total del animal en producción extensiva. El cerdo en producción extensiva permanece más tiempo de pie y, además, se desplaza para buscar el alimento. Ambas actividades incrementan sus necesidades energéticas respecto al animal que permanece estabulado. Nuestras estimaciones indican que en el cerdo Ibérico las necesidades energéticas relacionadas con esta actividad física son cuantitativamente pequeñas y podrían representar entre el 3,5 y 5% de sus necesidades energéticas totales (Lachica y Aguilera, 2000), dependiendo de la disponibilidad de recursos, orografía del terreno, etc. Los resultados aportados por todos estos estudios (valor nutritivo de los recursos disponibles, necesidades energéticas y proteicas, gasto energético de la

actividad física) ofrecen la posibilidad de llevar a cabo una explotación más racional del animal en producción extensiva.

De lo anterior cabe deducir que nuestro grupo de investigación ha dedicado una gran parte de su actividad científica a mejorar la eficiencia de producción del cerdo Ibérico a través de un mejor conocimiento del perfil metabólico del animal, y consecuentemente, de sus necesidades nutricionales; a la evaluación de la capacidad de los recursos alimenticios disponibles en su área geográfica de producción para proveer nutrientes, y en definitiva, a la producción de animales de óptima conformación al término del crecimiento-cebo para abordar la entrada en montanera. Ésta es esencial para generar productos de la máxima calidad. La búsqueda de un método de laboratorio preciso, capaz de identificar tales productos nos pareció un importante objetivo que abordamos en colaboración con el Dr. A. Delgado, del grupo de Biogeoquímica de Isótopos Estables de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC. Se trata de aplicar un método de análisis que evalúe de forma objetiva la alimentación seguida por el animal en la fase final de cebo previa al sacrificio, dado el papel fundamental que ésta tiene en la calidad de los productos obtenidos del cerdo Ibérico. La exactitud de las medidas viene garantizada por el empleo de materiales de referencia certificados.

USO DE ISÓTOPOS ESTABLES EN ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Los isótopos estables se han utilizado desde hace décadas en la resolución de problemas de naturaleza biológica; por ejemplo, para determinar fraudes en la elaboración de vinos y zumos, tipificación de las denominaciones de origen de vinos, en estudios metabólicos o de nutrición. Nuestro grupo de investigación los ha venido utilizando para la medida de procesos metabólicos relacionados con la utilización de la energía en la actividad física (en ganado caprino; Lachica, 1993; Prieto y col., 2001) o con el reciclado de la proteína en el organismo animal (cerdo Ibérico; Rivera Ferre y col., 2005 y 2006). Las relaciones isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ observadas en el colágeno residual presente en los restos de huesos y dientes se han utilizado por los arqueólogos para estudiar las paleodietas del hombre y de los animales (de Niro y Epstein, 1981; Bocherens y col., 1994; Privat y col., 2002).

Llegados a este punto y antes de abordar los resultados del estudio realizado sobre la aplicación del fraccionamiento isotópico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en la identificación del origen y calidad de los productos derivados del cerdo Ibérico, conviene recordar que los isótopos son distintas especies de un elemento químico que presentan un mismo **número atómico**, es decir, el mismo número de protones y electrones (lo que

les confiere idénticas propiedades químicas) pero que difieren en su **masa atómica** porque tienen en el núcleo distinto número de neutrones. Esto les confiere distintas propiedades físicas. Por ejemplo, en lo que respecta al carbono, encontramos en el isótopo más abundante en la naturaleza, el ^{12}C , 6 protones y 6 neutrones en el núcleo y 6 electrones en la corteza; su masa atómica, por tanto, es 12. El carbono 13 presenta un neutrón más en el núcleo y su masa atómica es, por lo tanto, 13. El carbono 12 es más ligero que el ^{13}C y esto hará que las moléculas que contienen ^{12}C ($^{12}\text{CO}_2$, por ejemplo) tengan más tendencia a la evaporación que las que formadas con ^{13}C ($^{13}\text{CO}_2$). Estas características distintas dan lugar a los procesos conocidos como **fraccionamiento isotópico**. Los distintos isótopos de un elemento pueden ser estables o inestables. Estos últimos son los isótopos radiactivos. Como su nombre indica, no son estables, sino que se desintegran espontáneamente para formar átomos de otros elementos emitiendo radiaciones en el proceso. En el caso del carbono el isótopo radioactivo o inestable es el ^{14}C .

En la naturaleza coexisten los distintos isótopos estables de los elementos (y también los radioactivos, aunque la proporción de éstos es mucho menor) y, en general, el más abundante es aquel que presenta menor masa atómica (aunque hay excepciones; por ejemplo, el Se). Esto ocurre en algunos de los elementos más abundantes en la materia orgánica, como el hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, entre otros. La distribución de los distintos isótopos estables de un elemento en la naturaleza es lo que se conoce como **abundancia natural** de este isótopo.

En la Figura 1 se indica la **abundancia natural** de los isótopos estables de algunos elementos. Muestra algunos de los más abundantes en la materia orgánica (H, C, N, O, S, Fe). En el caso del hidrógeno, el isótopo más abundante (99,985%) es el que presenta masa atómica 1, mientras que el deuterio, con masa atómica 2, sólo representa el 0,015% de todos los átomos de H presentes en la naturaleza. En el caso del C, como se puede observar, el ^{12}C supone el 98,89% del total de átomos de carbono y el ^{13}C , aproximadamente el 1,11 %, mientras que en el caso del nitrógeno, el isótopo más ligero, el ^{14}N representa el 99,63% del total y el ^{15}N es sólo el 0,37%.

Abundancia natural de distintos isótopos

Elemento	Isótopo estable	Abundancia natural (%)
H	1	99,985
	2	0,015
C	12	98,889
	13	1,111
N	14	99,634
	15	0,366
O	16	99,755
	17	0,039
	18	0,206
S	32	95,00
	33	0,76
	34	4,22
Fe	54	5,82
	56	91,66
	57	2,19
	58	4,22

Figura 1. Abundancia natural de diversos isótopos de elementos presentes en la materia orgánica.

La abundancia de los isótopos estables se cuantifica en unidades delta, en tanto por mil (con una precisión de $\pm 0,1\%$). Es una medida comparativa de la relación existente entre el isótopo más pesado y el más ligero entre la muestra a medir y un material de referencia. Para el carbono, sería la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en la muestra comparado con su material de referencia. Éste es un estándar internacional llamado PDB (Pee Dee Belemnita), un carbonato en el que, por tanto, su composición en delta ^{13}C se considera como cero. Materiales con riqueza en ^{13}C superior al PDB tendrán deltas ^{13}C positivos y aquéllos en los que la abundancia en ^{13}C sea menor que en el estándar PDB tendrán valores negativos de delta:

$$\delta\text{‰} = (R_{\text{muestra}} / R_{\text{estándar}} - 1) \times 1000$$

Para **Carbono** $R = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}$ $\delta^{13}\text{C}$ \longrightarrow $\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}$ Muestra vs. $\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}$ Estándar

Referencia **PDB** $\delta^{13}\text{C PDB} = 0$

Para el nitrógeno la abundancia isotópica vendría dada por la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en la muestra, comparada con la obtenida en su material de referencia, en este caso, nitrógeno del aire ambiental, que tiene asignado un valor en delta ^{15}N igual a cero. Análogamente a lo indicado en el caso del carbono, materiales con riqueza en ^{15}N superior al aire ambiente tendrán deltas ^{15}N positivos y aquellos en los que la abundancia en ^{15}N sea menor que en el aire ambiente tendrán valores negativos de delta:

$$\delta\text{‰} = (R_{\text{muestra}} / R_{\text{estándar}} - 1) \times 1000$$

Para **Nitrógeno** $R = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}$ $\delta^{15}\text{N}$ \longrightarrow $\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}$ Muestra vs. $\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}$ Estándar

Referencia **N₂ aire ambiental** $\delta^{15}\text{N aire} = 0$

Para cuantificar las relaciones entre los distintos isótopos de los elementos de un material se utilizan **espectrómetros de masas**. Aunque hay de varios tipos, unos más complejos que otros, en todos ellos es posible cuantificar la relación de masas

atómicas que nos interese. En estos equipos, el carbono presente en la muestra se transforma en CO_2 , de modo que obtendremos la relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$, es decir, la relación de masas 45/44 (Valor de R), tanto en la muestra problema como en el compuesto de referencia. En el caso del nitrógeno, la relación que se cuantifica es la 29/28 ($^{15}\text{N}^{14}\text{N}/^{14}\text{N}^{14}\text{N}$), pues el nitrógeno se transforma en N_2 , esto es, moléculas de nitrógeno, formadas por dos átomos de nitrógeno.

Ya se ha dicho que los isótopos de un elemento pueden tener distintas propiedades físicas. Esto da lugar a que no estén distribuidos de forma homogénea entre los organismos vivos, sino que se produzca el efecto conocido como **fraccionamiento isotópico**. Un claro ejemplo de este fraccionamiento es el que ocurre en las plantas según el ciclo fotosintético que utilicen. Es conocido que las plantas C3, (la mayoría de las plantas superiores, entre ellas, la mayoría de los cereales, que fijan el CO_2 vía *ciclo de Calvin*, (con reducción del CO_2 a fosfoglicerato, de 3 átomos de carbono), presentan una menor riqueza en ^{13}C que las plantas C4, entre las que se encuentra el maíz, que reducen el CO_2 a ácido aspártico o málico, de 4 átomos de carbono, en el ciclo de *Hatch y Slack*. En las plantas C3 encontramos valores para delta ^{13}C cercanos a -28, mientras que en las C4, con mayor riqueza en ^{13}C , este valor se aproxima a -12. Por esta razón los valores del cociente $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en los pastos de zonas templadas y frías (C3) son menores que los de las zonas tropicales (con mayor abundancia de especies C4) (aproximadamente -28 vs. -12‰; Minson y col., 1975) y estos valores se reflejan en los tejidos de los animales alimentados con uno u otro tipo de plantas (Minson y col., 1975; de Niro y Epstein, 1978; Tieszen y col., 1979; Metges y col., 1990). En otras palabras, la ingestión de plantas C4 eleva significativamente el contenido en ^{13}C de los tejidos del animal.

En el caso del nitrógeno la relación entre la composición isotópica de la dieta y de los tejidos animales ha sido estudiada en menor medida que para el carbono. Como sabemos el N es otro de los elementos más abundantes en los organismos vivos, principalmente como elemento constitutivo de proteínas y ácidos nucleicos. El aire es la fuente principal de nitrógeno; sin embargo, pocas especies pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas útiles para los organismos vivos. La etapa inicial es la fijación del nitrógeno atmosférico que llevan a cabo bacterias fijadoras que producen amoníaco, el cual puede ser oxidado a NO_2^- o NO_3^- por bacterias del suelo o incorporado a aminoácidos en los nódulos de las raíces de las leguminosas. Además, si tiene lugar fraccionamiento isotópico (uso preferencial de uno u otro isótopo) en mayor o menor medida durante la incorporación del nitrógeno a los tejidos de la planta, este fraccionamiento puede conducir a niveles distintos de abundancia natural de ^{15}N entre plantas o entre partes de planta, dependiendo de las vías metabólicas implicadas.

Son varios procesos en los que se observa un fraccionamiento isotópico del N, es decir, que los dos isótopos el ^{14}N y el ^{15}N no se encuentren distribuidos de forma homogénea en la naturaleza:

- Se ha demostrado que las plantas asociadas a las bacterias fijadoras de N (*Rhizobium*), las leguminosas, presentan valores de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ más bajos que las plantas no fijadoras de N. Su enriquecimiento en ^{15}N es próximo al del aire ambiental.
- En el organismo animal, el N corporal tiende a enriquecerse en ^{15}N , mientras que el N que se elimina en orina (urea en mamíferos, también en ácido úrico en aves y amonio en peces) tiende a empobrecerse en ^{15}N .

Varios estudios han constatado la existencia de un efecto por el cual al aumentar un eslabón en la **cadena trófica**, se produce un incremento de aproximadamente dos deltas en la abundancia en ^{15}N en el organismo. Esto es lo que se representa en la Figura 2, en la que vemos sucesivos incrementos de dos deltas entre las plantas, los animales herbívoros, los omnívoros y los carnívoros, respectivamente. Sin embargo, no se conocen los procesos biológicos que conducen a este fraccionamiento isotópico del N en el organismo de los animales y que nos permitan explicar con propiedad la relación entre la composición isotópica de la dieta y de los tejidos animales. Más aún, no sólo los procesos biológicos determinan el fraccionamiento isotópico, sino que es notoria la existencia de factores ajenos al organismo animal (geológicos, geográficos, climáticos, etc.) que pueden ejercer influencia sobre ellos.

Fraccionamiento isotópico

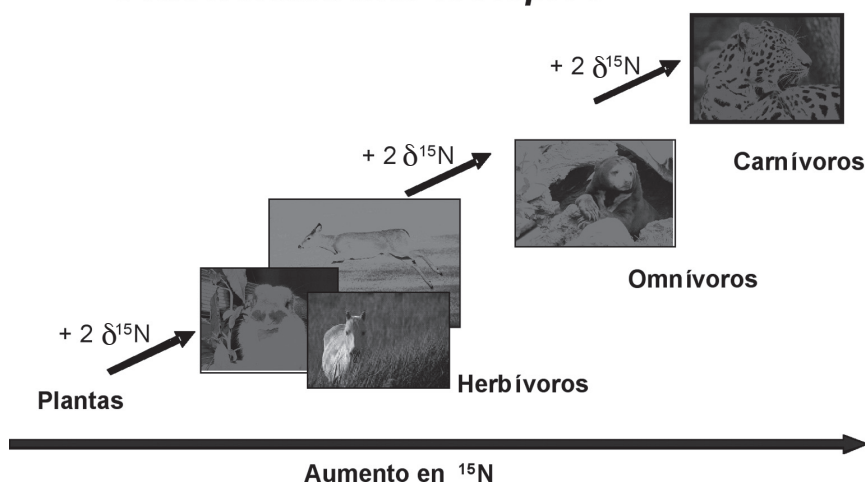


Figura 2. Aumento de la abundancia de ^{15}N en el organismo conforme a su posición más elevada en la cadena trófica.

MÉTODOS DE LABORATORIO APLICADOS A LA TRAZABILIDAD DE LOS PRODUCTOS DERIVADOS DEL CERDO IBÉRICO

Entre los métodos existentes para clasificar los productos derivados del cerdo Ibérico según el régimen alimenticio seguido durante la etapa final de cebo, el más comúnmente utilizado descansa en el análisis de las proporciones relativas de los ácidos grasos en la grasa subcutánea, o en otros tejidos, por cromatografía de gases (Cava y col., 1997; Ruiz y col., 1998; García-Olmo y col., 2002; García-Olmo y De Pedro, 2002). Esta técnica requiere cierto tiempo y no siempre discrimina satisfactoriamente (Porras-Tejeiro, 2009). La tecnología NIRS, basada en el análisis de los espectros en el infrarrojo próximo procedentes de preparaciones de productos derivados curados o en fresco (e incluso con posibilidades de aplicación "on line"), abre nuevas perspectivas para diferenciar el régimen alimenticio empleado a partir de modelos desarrollados con espectros NIRS e información de campo (García-Olmo y De Pedro, 2002). Adicionalmente, se ha propuesto el análisis isotópico del carbono (González-Martín y col., 1999) o de carbono y azufre (González-Martín y col., 2001) en tejido adiposo e hígado para discriminar la alimentación con bellota de la llevada a cabo con piensos o ingredientes comerciales. Seguidamente describimos sucintamente un grupo de trabajos de referencia en este campo.

Son varios los estudios publicados que se han realizado en el cerdo Ibérico en los que se ha pretendido identificar la dieta del animal mediante el análisis isotópico de sus tejidos. González-Martín y col. (1999) relacionan la abundancia de ^{13}C en los tejidos del cerdo ibérico con la alimentación recibida por el animal. Los experimentos se realizaron con cerdos Ibéricos puros y cruzados Ibérico x Duroc 75:25, sometidos a distinto tipo de alimentación durante el tiempo necesario para reponer 5 arrobas. Un grupo consumió sólo pienso comercial; otros, exclusivamente bellota o ésta complementada con pienso comercial, formulado a base de cebada, trigo y harina de torta de soja. Tras el sacrificio, se tomaron muestras en tejido adiposo (grasa dorsal a 5 cm de la cola), hígado y músculo (del jamón). Estos autores determinaron la riqueza en ^{13}C de distintos ingredientes utilizados en las dietas comerciales para cerdos, lo que les permitió observar que los ingredientes utilizados en el pienso comercial de este experimento presentaban una riqueza en ^{13}C entre -22 y -25 deltas, y otros ingredientes, como el gluten de maíz y el maíz, alrededor de -11 deltas de ^{13}C , como corresponde a una planta C4. La bellota muestra un valor de deltas en ^{13}C entre -21 y -24 deltas, propio de una planta C3. Este trabajo muestra que los análisis de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en músculo no permitían discernir sobre el tipo de alimentación recibida por el animal, ya que no existían diferencias en fraccionamiento isotópico entre los animales

que habían repuesto 5 arrobas alimentándose con bellota y los cebados con pienso. Sí aparecían diferencias entre las muestras de hígado y tejido adiposo, con valores menos enriquecidos en ^{13}C en las muestras de bellota ($-0,51 \delta$ y $-1,73 \delta$, respectivamente). La diferencia, bastante más amplia en el caso del tejido adiposo, les permite concluir que este tejido era el idóneo para realizar la comparación. De aquí que, utilizando datos de composición isotópica en tejido adiposo, establecieran una regresión lineal entre la riqueza en ^{13}C y las arrobas de bellota recibidas (x):

$$\delta^{13}\text{C} = -22,12 - 0,35 x; r = 0,982; s = 0,1\text{‰}$$

Lamentablemente, no se especifica el número de animales en el que se basa la relación, información esencial, bajo nuestro punto de vista, para su posible utilización. En un trabajo posterior estos mismos autores hacen uso del análisis de ^{13}C y de ^{34}S , un isótopo estable del azufre, para la discriminación de la dieta en el cerdo Ibérico (González-Martín y col., 2001). Los experimentos se realizaron con cerdos de genotipo Ibérico x Duroc 75:25 y cerdos blancos. Los cerdos Ibéricos hicieron una reposición de 5 arrobas con bellota o exclusivamente con pienso; los cerdos de capa blanca recibieron exclusivamente pienso. Los análisis isotópicos se realizaron sobre muestras de hígado. Los autores presentan la composición isotópica en ^{13}C y ^{34}S en distintos ingredientes utilizados para la fabricación de piensos, al igual que en caso anterior. Cabe destacar la mayor riqueza relativa en ^{34}S de la bellota ($\delta^{34}\text{S} = 9,12$) respecto a otros recursos alimenticios ($\delta^{34}\text{S} = 7,93 - 2,64$ para leguminosas y cereales), por lo que es de esperar mayor riqueza relativa de este isótopo en los cerdos alimentados con bellota. Al analizar el tejido hepático obtuvieron diferencias de 1,8 deltas ^{13}C entre cerdos Ibéricos de bellota y de pienso, y una diferencia mayor, 2,21 deltas ^{13}C entre cerdos Ibéricos de bellota y cerdos blancos. Estos últimos y los cerdos Ibéricos de pienso presentaban valores de delta ^{13}C muy similares. El análisis de ^{34}S discriminaba bien las muestras de cerdo Ibérico de bellota y cerdo Ibérico de pienso, con una diferencia de 2,5 deltas, pero los cerdos Ibéricos de bellota presentaban valores similares a los cerdos de capa blanca. La combinación de ambos análisis permitió una mejor diferenciación de los tres grupos de muestras, como podemos apreciar en la Figura 3.

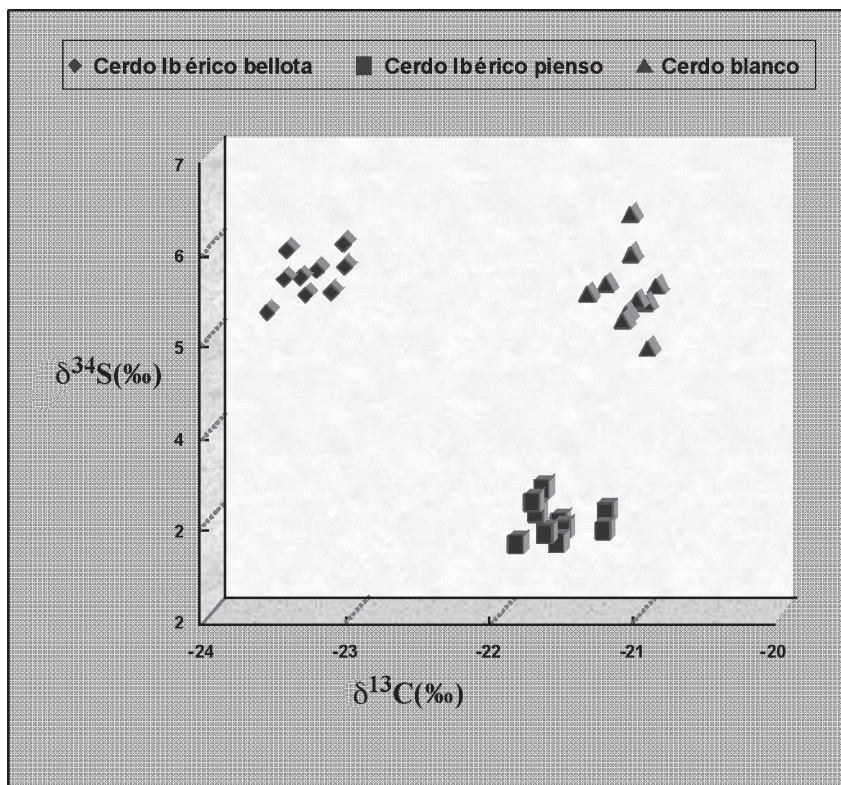
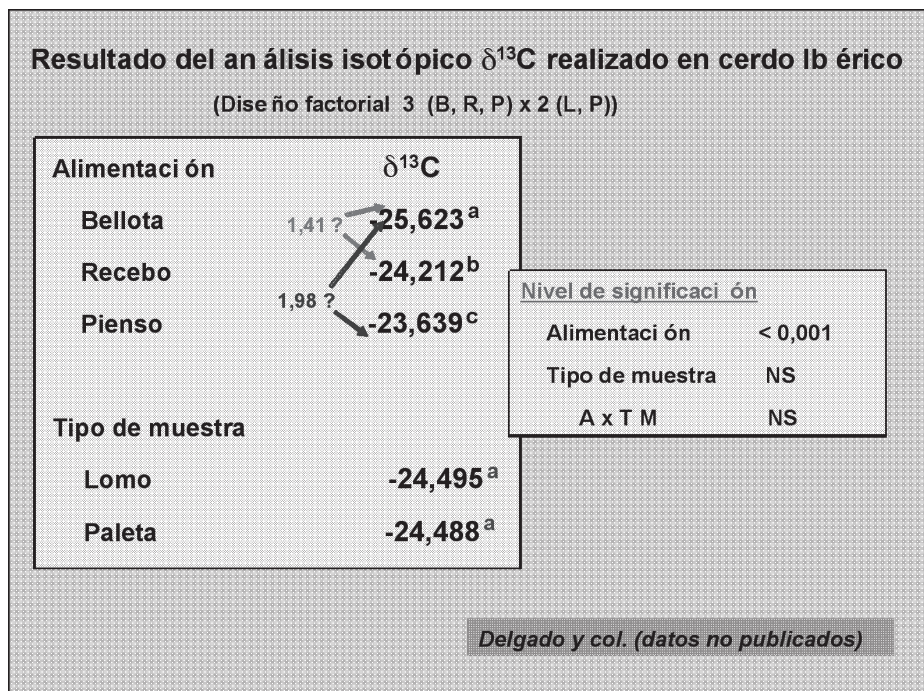


Figura 3. $\delta^{34}\text{S}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en muestras de hígado de cerdos Ibéricos cruzados y cerdos de capa blanca alimentados con bellota o pienso (González-Martín y col., 2001)

Más recientemente se ha aplicado el análisis isotópico $\delta^{13}\text{C}$ a ésteres metílicos de los ácidos grasos de grasa fundida en horno de microondas, procedente de tejido adiposo de cerdos sometidos a distinto tipo de alimentación (Recio, 2010). Las determinaciones isotópicas se llevan a cabo en un espectrómetro de masas de flujo continuo al que se acopla un cromatógrafo de gases mediante una interfase constituida por un horno de combustión. En el caso que nos ocupa, los ésteres metílicos separados por cromatografía capilar pasan al detector del cromatógrafo, para su detección y cuantificación, o a través de la unidad de combustión, donde el carbono se oxida completamente a CO_2 , al espectrómetro en que se realiza su análisis isotópico. Esta técnica puede resolver problemas de mayor complejidad como los que puede generar la incorporación a los piensos de grasas animales y aceites vegetales, con perfil de ácidos grasos que pudiera aproximarse al que se observa en un animal cebado en montanera. Dado que en todas las muestras están presentes los ácidos oleico (C18:1),

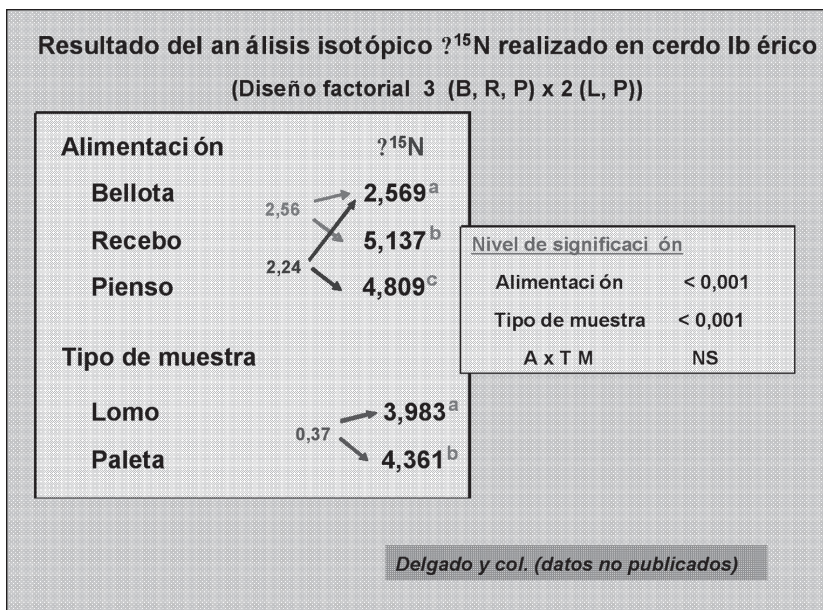
palmítico (C16:0), linoleico (C18:2) y esteárico (C18:0), sus ésteres metílicos son los utilizados para discernir sobre el tipo de alimentación que tuvo el animal. De estos ácidos, el oleico es buen discriminante. Los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{C18:1}}$ son muy bajos, inferiores a $-25,9\text{‰}$ si el cerdo del que procede la muestra analizada consumió exclusivamente bellota en su fase de cebo, previa al sacrificio. Cuando el análisis se realiza en muestras de cerdos alimentados con piensos el análisis isotópico es de más compleja interpretación, si bien el estudio conjunto de las abundancias isotópicas de los cuatro ácidos grasos discrimina con claridad al animal cebado a pienso respecto al de bellota o recebo, este último de discriminación más problemática, lo que es explicable por la amplia variabilidad que puede existir en ingredientes que formen parte del pienso complementario a la bellota y por las características del manejo nutricional. En este punto el análisis isotópico $\delta^{15}\text{N}$ puede ser muy eficaz como discriminante. Los datos que aporta nuestro propio trabajo, que describimos seguidamente, son de reveladores al respecto.

En colaboración con el grupo de Biogeoquímica de Isótopos Estables de la Estación Experimental del Zaidín y Sánchez Romero Carvajal Jabugo nuestro grupo de investigación llevó a cabo un estudio en el que se emplearon muestras de 75 cerdos Ibéricos puros de la estirpe Silvela, procedentes de la citada empresa (Delgado y col., resultados no publicados). Los animales se distribuyeron al azar en tres lotes homogéneos y recibieron al alcanzar los 100 Kg de peso vivo, uno de los siguientes tratamientos: Sólo bellota; bellota y pienso, o sólo pienso. Al sacrificio, realizado a los 160 Kg de peso, se tomaron muestras de lomo y paleta. En estas muestras se analizó la riqueza en ^{13}C y en ^{15}N aplicando un análisis factorial 3 (alimentación: bellota, recebo y pienso) \times 2 (tipo de muestra: lomo y paleta). Los resultados del análisis isotópico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ son los que figuran en el siguiente esquema:



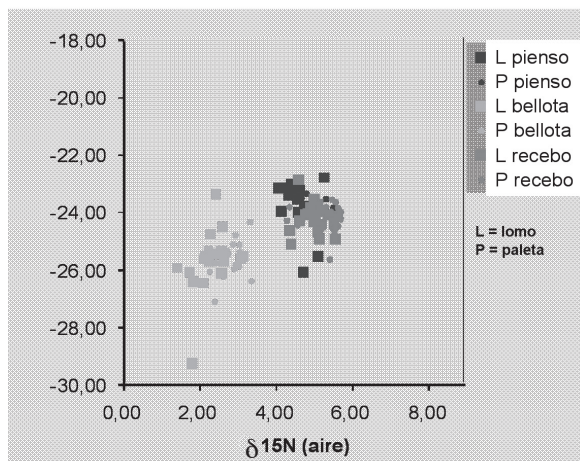
Observamos un efecto muy significativo de la alimentación recibida por el animal ($P < 0,001$). Como en los estudios anteriores, los animales alimentados con bellota presentaban menor riqueza relativa de ^{13}C respecto a los que no habían recibido bellota. Las diferencias entre grupos fueron de 1,41 deltas entre las muestras de bellota y recebo, y de 1,98 entre bellota y pienso. La diferencia entre los grupos de recebo y pienso fue de tan sólo 0,57 deltas. No obtuvimos diferencias en riqueza en ^{13}C entre los dos tipos de músculos empleados.

También se obtuvo un efecto muy significativo al analizar la riqueza en ^{15}N de las muestras de músculo ($P < 0,001$). En este caso, además los valores eran significativamente distintos en los dos tipos de muestras empleados ($P < 0,001$). Las muestras de músculo de los cerdos alimentados con bellota presentaban menor riqueza relativa en ^{15}N respecto a los otros dos tipos de muestras. Las diferencias entre las muestras de los cerdos que habían recibido bellota y los otros dos grupos eran de mayor amplitud que las obtenidas en el caso del carbono: 2,56 deltas de ^{15}N respecto a los de recebo y 2,24 deltas respecto a los de pienso. La diferencia entre los grupos de recebo y pienso fue de sólo 0,33 deltas, aunque también significativa. Las muestras de lomo y paleta presentaban una diferencia de tan sólo 0,37 deltas de ^{15}N , pero muy significativa. Todo ello aparece en el siguiente esquema:



Al combinar todos los datos, observamos un grupo bien diferenciado correspondiente a las muestras de lomo y paleta de los cerdos de bellota, representado en verde, mientras que las muestras de recebo y pienso tienden a formar un grupo común no diferenciado.

Resultados del estudio de trazabilidad mediante isótopos estables de C y de N en el cerdo Ibérico



Delgado y col. (datos no publicados)

Nuestra conclusión es que la técnica es prometedora, discrimina bien las muestras de músculo de los cerdos de bellota, pero no los de recebo y pienso. Además, habría otros factores a tener en cuenta y que podrían afectar estas variables, como la localización geográfica, el lugar anatómico del muestreo, etc. Existen, pues, aspectos que sugieren la utilidad de esta técnica isotópica para la identificación de la alimentación recibida por el cerdo Ibérico en su fase final de cebo. Sin embargo, hay otros que requieren un estudio más profundo y sistemático, antes de que pueda ser efectivamente un método alternativo o complementario a los ya existentes en análisis de trazabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Barea, R., Nieto, R., Lara, L., García, M.A., Vilchez, M.A., Aguilera, J.F. 2006. Effects of dietary protein content and feeding level on carcass characteristics and organ weights of Iberian pigs growing between 50 and 100 kg body weight. *Animal Science* 82, 405- 413.
- Barea, R., Nieto, R., Aguilera J.F. 2007. The effects of dietary protein content and feeding level on protein and energy metabolism in Iberian pigs growing from 50 to 100 kg body weight. *Animal* 1, 357-365.
- Bocherens, H., Fizet, M., Mariotti, A. 1994. Diet, physiology and ecology of fossil mammals as inferred from stable carbon and nitrogen isotope biogeochemistry: implications for Pleistocene bears. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 107, 213-225.
- Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C, Martín, L., García, C., Ventanas, J., Antequera, T. 1997. Influence of the finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the Iberian pig. *Meat Science* 45, 263-270.
- De Niro, M., Epstein, S. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495-506.
- De Niro, M., Epstein, S. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals . *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 341-351.
- Fernández-Fígares, I., Lachica, M., Nieto, R., Rivera-Ferre, M.G., Aguilera, J.F. 2007. Serum profile of metabolites and hormones in obese (Iberian) and lean (Landrace) growing gilts fed balanced or lysine-deficient diets. *Livestock Science* 110, 73-81.
- Fernández-Fígares, I., Conde-Aguilera, J.A., Nieto, R., Lachica, M., Aguilera, J.F. 2008. Synergistic effects of betaine and conjugated linoleic acid on growth and carcass composition of growing pigs. *Journal of Animal Science* 86, 102-111.
- García-Olmo, J., De Pedro, E. 2002. Evaluación del régimen alimenticio en canales y productos del cerdo Ibérico. *Sólo Cerdo Ibérico* 8, 53-59.
- García-Olmo, J., De Pedro, E., Garrido, A., Paredes, A., Sanabria, C., Santolalla, M., Salas, J., García-Hierro, J. R., González, I., García-Cachan, M.D., Guirao, J. 2002. Determination of the precision of the fatty acid analysis of Iberian pig fat by gas chromatography. Results of a mini collaborative study. *Meat Science* 60, 103-109.
- García-Valverde, R., Nieto, R., Lachica, M., Aguilera, J.F. 2007. Effects of herbage ingestion on the digestion site and nitrogen balance in heavy Iberian pigs fed on an acorn-based diet. *Livestock Science* 112, 63-77.
- García-Valverde, R. Barea, R., Lara, L., Nieto, R., Aguilera, J.F. 2008. The effects of feeding level upon protein and fat deposition in Iberian heavy pigs. *Livestock Science* 114, 263-273.

- González-Martín, I. González-Pérez, C., Hernández Méndez, J., Marqués-Macías, E., Sanz Póveda, R. 1999. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian breed swine. *Meat Science* 52, 437-441.
- González-Martín, I. González-Pérez, C., Hernández Méndez, J., Sánchez González, C. 2001. Differentiation of dietary regimen of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. *Meat Science* 58, 25-30.
- Hatch, M.D., Slack, C.R. 1966. Photosynthesis by sugarcane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemistry Journal* 101, 103-111.
- Lachica, M., 1993. Estimación del gasto energético de la actividad física en ganado caprino. Comparación de técnicas calorimétricas y no calorimétricas. Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Lachica, M., Aguilera, J.F. 2003. Estimation of energy needs in the free-ranging goat with particular reference to the assessment of its energy expenditure by the ^{13}C -bicarbonate method. *Small Ruminant Research* 49: 303-318.
- Lachica, M., Aguilera, J.F. 2000. Estimation of the energy costs of locomotion in the Iberian pig (*Sus mediterraneus*). *British Journal of Nutrition* 83, 35-41.
- MARM. 2010. <http://www.marm.es/>
- Metges, C., Kempe, K., Schmidt H-L. 1990. Dependence of the carbon isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the $\delta^{13}\text{C}$ value of food in dairy cows. *British Journal of Nutrition* 63, 187-196.
- Minson, D. J., Ludlow, M. M., Troughton, J. H. 1975. Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures. *Nature* 256 (5518), 602.
- Nieto, R., Lara, L., García, M.A., Gómez, F., Zalvide, M., Cruz, M., Pariente, J.M., Moreno, A., Aguilera, J.F. 2001. Evaluación de un sistema integrado de alimentación en el cerdo Ibérico. Análisis del consumo de alimento e índices productivos. *Sólo Cerdo Ibérico* 6, 57-69.
- Nieto, R., Lara, L., García, M.A., Vílchez, M.A., Aguilera, J.F. 2003. Effects of dietary protein content and feed intake on carcass characteristics and organs weight of Iberian pigs growing from 15 to 50 kg body weight. *Animal Science* 77, 47-56.
- Nieto, R., Miranda, A., García, M.A., Aguilera, J.F. 2002a. The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50 kg body weight. *British Journal of Nutrition* 88, 39-49.
- Nieto, R., Rivera, M., García, M.A., Aguilera, J.F. 2002b. Amino acid availability and energy value of acorn in the Iberian pig. *Livestock Production Science* 77, 227-239.
- Porras-Tejeiro, C.J., Pérez Almero, J.L., Brun Esquiliche, P., Casas Millán, C. 2009. Validez analítica de los ácidos grasos en cerdo Ibérico. *Sólo Cerdo Ibérico*, 21, 85-89.
- Prieto, C, Lachica, M., Nieto, R., Aguilera, J.F. 2001. The ^{13}C -bicarbonate method: its suitability for estimating the energy expenditure in grazing goats. *Livestock Production Science* 69, 207-215.
- Privat, K. L., O'Connell, T. C., Richards, M.P. 2002. Stable isotope analysis of human and faunal remains from the Anglo-Saxon cemetery at Berinsfield, Oxfordshire: Dietary and social implications. *Journal of Archaeological Science* 29, 779-790.
- Recio, C. 2010. Métodos isotópicos como herramienta para determinar la alimentación aportada al cerdo Ibérico (GC-C-IRMS de ácidos grasos y otras técnicas). *Sólo cerdo Ibérico* 23, 29-45.
- Rivera-Ferre, M.G., Aguilera J.F., Nieto, R. 2005. Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine deficient diets. *Journal of Nutrition* 135, 469-478.
- Rivera-Ferre, M.G., Aguilera J.F., Nieto, R. 2006. Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Animal Science* 84, 3346-3355.

- Ruiz, J., Cava, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., López-Bote, C. 1998. Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid profile of subcutaneous fat, muscle and hepatic fat. *Meat Science* 49, 155-163.
- Tieszen, L. L., Hein, D., Qvortrup, S. A., Troughton, J. H., Imbamba, S. K. 1979. Use of $\delta^{13}\text{C}$ values to determine vegetation selectivity in East African herbivores. *Oecologia* 37, 351-359.

