



Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Los isótopos estables de Carbono y Nitrógeno como biomarcadores para la trazabilidad alimentaria

Os isótopos estables de Carbono e Nitróxeno como biomarcadores para a trazabilidade alimentaria

Carbon and Nitrogen stable isotopes as biomarkers for food traceability



Alejandra Vidal Fernández

Junio, 2017

Tutoras Académicas: Aurora Grandal-d'Anglade y Ana García Vázquez

Índice

Resumen.....	1
Resumo.....	1
Summary.....	2
Palabras clave.....	2
Keywords.....	2
1. Introducción.....	3
1.1. Trazabilidad alimentaria e isótopos estables.....	3
1.2. Factores que determinan las señales isotópicas de C y N en tejidos animales ..	4
1.3. Casos de estudio	4
1.3.1. Pollo.....	4
1.3.2. Vacuno.....	5
1.3.2.1 Ternera Gallega	6
1.3.3. Cerdo	6
1.3.3.1. Cerdo Ibérico.....	7
1.3.3.2. Suplementos de ácido oleico	8
1.3.3.3. Alimentación a base de castañas	9
3. Materiales y métodos	11
3.1. Obtención de las muestras.....	11
3.2. Desengrasado de la carne	12
3.3. Preparación de las muestras para el análisis	14
3.4. Análisis de isótopos estables	14
4. Resultados	15
5. Discusión.....	19
5.1. Pollo.....	19
5.2. Vacuno.....	20
5.3. Cerdo.....	21
6a. Conclusiones.....	22
6b. Conclusions.....	23
7a. Bibliografía	24
7b. Webgrafía.....	26

Resumen

El análisis de isótopos estables mediante espectrometría de masas para relaciones isotópicas (E.M.R.I.) es una herramienta clave en la trazabilidad alimentaria por su potencial para reconstruir la dieta de los animales a partir de los valores isotópicos en los productos cárnicos derivados de ellos. Se tomaron 13 muestras de productos cárnicos de pollo, vacuno y cerdo, algunos de marcas conocidas, otros de marca blanca y otros procedentes de cría particular, con distintos grados de conocimiento sobre los regímenes de alimentación de los animales de los cuales procedían. Se tomaron también muestras de posibles alimentos de interés: bellota, castaña, maíz, pienso y hierba. Todas las muestras (las de carne desengrasadas previamente) fueron cuidadosamente homogeneizadas y enviadas a los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña para el análisis de los isótopos estables de carbono y nitrógeno. Los datos así obtenidos de las muestras de carne y alimentos fueron comparados entre sí y con respecto a datos procedentes de la literatura preexistente. La señal isotópica de ^{13}C resultó útil para comprobar la alimentación a base de maíz en pollos y a base de pasto en vacuno. La señal isotópica de ^{15}N permitió detectar la leche materna en la dieta de terneras y la adición de proteína animal a los piensos en ayojo y vacuno. Los análisis no sirvieron para diferenciar de forma fiable a los pollos camperos de los pollos criados en cautividad, ni para identificar de forma concluyente alimentación con bellotas o castañas en cerdos.

Resumo

A análise dos isótopos estables con espectrometría de masas para relacións isotópicas (E.M.R.I.) é unha ferramenta clave na trazabilidade alimentaria polo seu potencial para reconstruír a dieta dos animais a partir dos valores isotópicos dos produtos cárnicos derivados deles. Tomáronse 13 mostras de produtos cárnicos de polo, vacún e porco, algúns de marcas coñecidas, outros de marca branca e outros procedentes de cría particular, con distintos graos de coñecemento sobre os réximes de alimentación dos animais dos cales procedían. Tomáronse tamén mostras de posibles alimentos de interese: landra, castaña, millo, penso e herba. Todas as mostras (as de carne previamente desengraxadas) foron coidadosamente homoxeneizadas e mandadas aos Servizos de Apoio a Investigación (SAI) da Universidade da Coruña para a análise dos isótopos estables de carbono e nitróxeno. Os datos así obtidos das mostras de carne e alimentos foron comparados entre si e con datos procedentes da literatura preexistente. O sinal isotópico de ^{13}C resultou útil para comprobar a alimentación a base de millo en polos e a base de pasto en vacún. As análises non serviron para diferenciar de maneira fiable aos polos

campeiros dos polos criados en cativerio, nin para identificar de forma concluinte alimentación a base de landras ou castañas en porcos.

Summary

Stable isotope analysis (S.I.A.) by isotope ratio mass spectrometry (I.R.M.S.) is a key tool for alimentary traceability thanks to its potential for the reconstruction of animal diets using the isotopic values of meat products. 13 samples of poultry, beef and pork meat products were collected, some from well-known brands, some from white-label brands and some from private breeding, with various degrees of knowledge about the feeding regime of the animals from which the products were originated. Samples of useful feeds: acorn, chestnut, corn, grass and commercial feed, were also taken. Every sample (the meat ones being previously degreased) was carefully homogenized and sent to the research support service of Universidade da Coruña for the analysis of stable isotopes of carbon and nitrogen. The obtained data from the meat and feed samples were contrasted with each other and with data from preexisting literature. The isotopic signature of ^{13}C was useful to check the authenticity of corn-fed chicken and grass-fed beef. The isotopic signature of ^{15}N allowed detection of breastfeeding in the diet of cattle and animal protein feeding in older beef animals. In contrast, this method didn't allow an effective discrimination between free-range and barn chickens, nor a certain identification of acorn or chestnut feeding in pigs.

Palabras clave

Trazabilidad alimentaria; isótopos estables; ^{13}C ; ^{15}N ; productos cárnicos; pollo; cerdo; vacuno

Keywords

Alimentary traceability; stable isotopes; ^{13}C ; ^{15}N ; meat products; poultry; pork; beef

1. Introducción

1.1. Trazabilidad alimentaria e isótopos estables

Hoy en día es de vital importancia contar con métodos para garantizar a los consumidores la calidad de los alimentos que compran. La globalización implica que cada vez más alimentos se están intercambiando alrededor del mundo, estando disponible en el mercado una enorme variedad de ellos. Determinar la autenticidad de estos alimentos requiere asegurar que su etiquetado sea correcto y que cumplan todos los requerimientos necesarios para adoptar una denominación determinada, así como detectar sustituciones de ingredientes por otros similares pero más baratos y otros procesos no declarados. Una herramienta clave para que esto sea posible es la trazabilidad alimentaria, ampliamente extendida como método de control de riesgo en la Unión Europea. Y una de las técnicas más utilizadas en trazabilidad alimentaria es el análisis de los isótopos estables mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas (E.M.R.I.). (Camin *et al.*, 2016).

En primer lugar, recordar que los isótopos son distintas formas de un mismo elemento químico que tienen un mismo número atómico (de protones) pero distinto número de neutrones. Muchos elementos tienen dos o más isótopos de forma natural, por ejemplo el nitrógeno existe mayoritariamente en forma de ^{14}N , pero tiene una variante más pesada y bastante menos común que es el ^{15}N . Las diferencias de masa entre los isótopos de un mismo elemento hacen que se comporten de forma distinta en muchos procesos ambientales (climáticos, geológicos, etc) y fisiológicos, con lo que se producen variaciones en su abundancia relativa, pudiendo aumentar o disminuir sus proporciones. A este fenómeno se le denomina fraccionamiento isotópico (Crawford *et al.*, 2008).

Los tejidos de los animales son sintetizados a partir de los nutrientes de los alimentos que ingieren y por lo tanto su composición isotópica va a depender en gran parte de la dieta. Así, los alimentos dejan una señal que no puede ser alterada de forma artificial y que resulta muy útil para la trazabilidad alimentaria, teniendo múltiples aplicaciones. Una de ellas es la reconstrucción de la dieta de un animal analizando los valores isotópicos de los productos cárnicos. Esto es importante desde el punto de vista sanitario, por ejemplo, para evitar la expansión de enfermedades originadas por una alimentación inadecuada del ganado (como la famosa “enfermedad de las vacas locas”). También es importante por razones económicas, para evitar entre otras cosas que animales criados en cautividad sean vendidos como animales de pasto, que son más valorados. La mayoría de estos estudios utilizan como criterio las señales isotópicas del carbono y el nitrógeno (Camin *et al.*, 2016).

1.2. Factores que determinan las señales isotópicas de C y N en tejidos animales

La señal isotópica del carbono en el tejido animal se utiliza sobre todo para determinar la dieta de animales herbívoros u omnívoros, pues varía mucho según el tipo de plantas que consuman. Esto sucede porque en las plantas con diferentes tipos de metabolismo fotosintético, las enzimas carboxilasas poseen distinta capacidad de discriminación isotópica (Camin *et al.*, 2016). La ruta fotosintética de Calvin-Belson utilizada por las plantas C3 como el trigo o la remolacha azucarera fija una menor cantidad del isótopo ^{13}C que la ruta de Hatch-Slack de las plantas C4 como el maíz y la caña de azúcar. Como consecuencia, las plantas C3 tienen una relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ más negativa que las C4 (Rhodes *et al.*, 2010). Es por esto que si aumenta el porcentaje de maíz en la dieta de un animal, su proporción de ^{13}C también aumentará. Hay que tener en cuenta que el tejido animal no va a reflejar exactamente la composición isotópica de la dieta, si no que va existir cierto fraccionamiento isotópico que consiste, de forma general, en un incremento del 1‰ del isótopo más pesado (Camin *et al.*, 2016).

En cuanto a la señal isotópica del nitrógeno, es interesante en este contexto por su utilidad para determinar el nivel trófico de los animales. A medida que se asciende dentro de la cadena trófica, cada eslabón tiene una mayor proporción de ^{15}N que el anterior, siendo el fraccionamiento isotópico de un 2‰ a un 4‰ por nivel (Crawford *et al.*, 2008). Se observa un fenómeno similar en los animales lactantes. Al alimentarse tan solo de la leche que les proporciona su madre, su señal isotópica se corresponde con un nivel trófico superior al de esta. Durante el destete, los valores se van aproximando gradualmente a los del adulto en función al porcentaje de leche en su alimentación total (Jenkins *et al.*, 2001).

1.3. Casos de estudio

En este estudio se han utilizado los isótopos estables ^{13}C y ^{15}N para la trazabilidad alimentaria de tres tipos de productos cárnicos: pollo, vacuno y cerdo.

1.3.1. Pollo

En la industria alimentaria del pollo se distinguen dos grandes grupos en general: por un lado los animales criados en cautividad cuya dieta es proporcionada exclusivamente por el productor y por otro lado los llamados pollos de corral o “camperos” que gozan de cierta libertad y pueden imitar sus hábitos de alimentación naturales, comiendo no solo hierba sino también pequeños invertebrados como lombrices e insectos. Es importante contar con

un método fiable para diferenciarlos ya que los pollos camperos alcanzan normalmente un precio más elevado. Para esto es especialmente útil la señal isotópica del nitrógeno, pues en los pollos camperos los valores de ^{15}N suelen ser más altos gracias a la fuente adicional de proteína animal que obtienen al ingerir los invertebrados del suelo. Sin embargo hay que considerar que ciertas combinaciones de ingredientes en la dieta pueden conducir a unos valores isotópicos similares a los que se encuentran en los pollos camperos, por ejemplo, la adición de algún tipo de proteína animal (como médula de hueso) al pienso (Coletta *et al.*, 2012).

Otra utilidad es comprobar la autenticidad de una alimentación a base de maíz. Que un pollo haya sido alimentado con maíz significa que su dieta debe estar compuesta por al menos un 50% de maíz y que dicho alimento se le tiene que haber proporcionado durante la mayor parte de su periodo de engorde. El método de los isótopos estables tiene importancia porque la coloración amarilla que normalmente se asocia con una dieta a base de maíz se puede falsear añadiendo carotenoides al alimento, y otros métodos analíticos como el estudio de la composición lipídica del animal no son fiables ya que puede modificarse el contenido en grasa de los alimentos para que imite los perfiles de ácidos grasos, esteroides y triglicéridos deseados (Rhodes *et al.*, 2010). Al ser el maíz una planta C4, la adición de este ingrediente a la dieta resultará en un aumento de la proporción del isótopo ^{13}C en los tejidos del pollo.

1.3.2. Vacuno

Mayoritariamente existen dos regímenes comunes en la alimentación del ganado vacuno. El régimen convencional se basa en alimentar a los animales mayoritariamente con grano (sobre todo maíz). El otro se basa tan solo en hierba (pasto) y muchas veces se describe como “ganadería orgánica”. La señal isotópica del carbono difiere según estos tipos de alimentación, pues los niveles de ^{13}C en el músculo son normalmente mayores en los alimentados con grano que en los alimentados con hierba (Kim *et al.*, 2012). Esto se cumple en zonas templadas porque la mayor parte de las gramíneas son plantas C3. Los resultados podrían ser distintos de estar en una zona tropical o subtropical donde las gramíneas son mayoritariamente plantas C4 (De Smet *et al.*, 2004).

La señal isotópica del nitrógeno también tiene su utilidad. De encontrarse un animal cuya señal sea muy elevada, podría interpretarse de dos formas. Una de ellas es que haya recibido una dieta enriquecida con proteína animal, aspecto de especial atención en el ganado vacuno por la relación existente entre la ingesta de proteína procedente de animales enfermos y el desarrollo de la Encefalopatía Espongiforme Bovina, transmisible a los humanos. Antes de que surgiese esta epidemia, era común utilizar carne y médula de hueso procedentes de ganado bovino en las dietas de muchos animales. Hoy en día

su uso está prohibido en rumiantes para prevenir el desarrollo de nuevos casos (Carrijo *et al.*, 2006). La otra posibilidad es que se tratase de un animal lactante y es especialmente importante para el siguiente sub-apartado.

1.3.2.1 Ternera Gallega

Ciertas carnes gozan de un estatus especial por sus particulares características de producción. Ejemplos son alimentos con denominación de origen protegida (D.O.P.) y/o indicación geográfica protegida (I.G.P.), que requieren robustos sistemas de trazabilidad para protegerlos del fraude y autentificar a los animales y a los alimentos que se derivan de ellos (Osorio *et al.*, 2011).

En el caso de la “I.G.P. Ternera Gallega” la calidad está en gran parte determinada por el tiempo de lactancia de las terneras, que influye en el precio final de los productos cárnicos derivados de ellas. Según esta I.G.P., se denomina ternera a los animales que se sacrifican con menos de 10 meses de edad, y se diferencian dos categorías: los que se crían en explotaciones con vacas madre y que han tenido un período mínimo de lactación materna de siete meses, a los que se les confiere la categoría “Ternera Gallega Suprema”; y los que se destetan a diferentes edades, siendo la base de su alimentación los forrajes autorizados por el Consejo Regulador, denominados simplemente “Ternera Gallega” (D.O.G. del 5 de abril de 2010).

Como ya se ha mencionado, en los mamíferos la lactancia produce una señal isotópica diferente en las crías que indica un nivel trófico superior al de los adultos y, a medida que abandonan la lactancia, se va pareciendo cada vez más a la de estos. Así, podría utilizarse la señal isotópica del nitrógeno para comprobar que los periodos de lactancia han sido los adecuados para cada denominación.

1.3.3. Cerdo

Los parámetros que más afectan a la calidad de la carne de cerdo son el contenido de grasa intramuscular y la composición de esta, en especial de los ácidos grasos. Un alto contenido de grasa en los músculos tiene una influencia positiva, especialmente en los productos curados, sobre numerosas cualidades sensoriales como el sabor, la ternura, o la jugosidad (Temperan *et al.*, 2014). Estos parámetros son afectados significativamente por la dieta que el animal recibe. Una relación proteínas/valor calorífico baja en las dietas deriva en una alta deposición de grasa en los tejidos porcinos (Ventanas *et al.*, 2007). Una posible explicación es que las dietas bajas en proteína estimulan la actividad de las enzimas lipogénicas del músculo, incrementando la síntesis de ácidos grasos de novo. Es importante controlar la composición de esta grasa por la relación existente entre el consumo de colesterol y ácidos saturados y las

enfermedades cardiovasculares (Domínguez *et al.*, 2015). Además, la composición lipídica también influye en las cualidades sensoriales de la carne de cerdo. Una alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados es importante para que los productos de curados alcancen el sabor apropiado (Fernández *et al.*, 2003).

Dos estrategias alternativas a la explotación porcina intensiva a base de pienso con el fin de mejorar estos parámetros son la alimentación a base de bellotas y a base de castañas.

1.3.3.1. Cerdo Ibérico

El cerdo Ibérico es una raza autóctona de la península Ibérica. Los factores principales que influyen en la alta calidad de su carne son dos: la propia raza y la alimentación que los animales reciben durante el periodo final de engorde (González-Martin *et al.*, 1999). Los productos derivados del cerdo Ibérico pueden caer en tres categorías en función de la dieta: se denomina “de cebo” a los productos de animales que han sido alimentados con piensos constituidos fundamentalmente por cereales y leguminosas; “de cebo de campo” en caso de animales que además de recibir pienso pueden aprovechar los recursos del campo; y “de bellota” a productos de animales sacrificados inmediatamente después del aprovechamiento exclusivo de los recursos naturales de la dehesa, sin aporte de pienso suplementario (B.O.E. del 11 de Enero de 2014). La dehesa es un ecosistema de bosque Mediterráneo en el que los cerdos engordan mayoritariamente a base de hierba y bellotas, siendo llamados “de montanera”. Los productos procedentes de estos son cerdos los que tienen mayor calidad, alcanzando los precios más altos en el mercado.

Las bellotas poseen un alto valor calorífico y un contenido en proteínas relativamente bajo (Ventanas *et al.*, 2007). Esto, junto a la gran capacidad fisiológica de la raza para almacenar grasa en el músculo, lleva a que el contenido de grasa intramuscular sea elevado. Las bellotas también tienen un elevado porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados, particularmente ácido oleico (53-54%) y concentraciones muy bajas de ácidos grasos saturados como el palmítico y el esteárico. Además, son ricas en α -tocoferol, γ -tocoferol y taninos. Por su parte, la hierba es una fuente de ácidos grasos poliinsaturados, sobre todo linoleico, y también es rica en α -tocoferol y otros compuestos fenólicos (Tejerina *et al.*, 2011).

El ácido oleico es especialmente importante, pues influye de forma decisiva en muchas características sensoriales de la carne como brillo, oleaginosidad, jugosidad, dulzor, consistencia de la grasa y aroma (Pugliese *et al.*, 2013). En cuanto a los altos niveles de ácidos grasos monoinsaturados en general y tocoferol, sirven para disminuir la intensidad de las reacciones oxidativas en el músculo porcino, que en los productos de Cerdo Ibérico se asocian con

pérdidas de calidad incluyendo deterioro del aroma, color y textura y la generación de compuestos tóxicos (Ventanas *et al.*, 2007).

Los beneficios para el consumidor no se limitan a unas mejores propiedades sensoriales. Los antioxidantes presentes en la carne y los productos curados del cerdo Ibérico de montanera son buenos para la salud. Los tocoferoles, taninos y demás compuestos fenólicos son muy valorados por sus capacidades antioxidantes y de neutralización de radicales libres, de ahí su potencial para paliar procesos degenerativos (Tejerina *et al.*, 2011). Además, consumir productos de cerdos de montanera tiene una influencia positivamente en los niveles de colesterol gracias al elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados (Ventanas *et al.*, 2007). Como ejemplo concreto, está demostrado que el ácido oleico presente en el jamón de cerdo ibérico alimentado con bellotas contribuye al descenso de los niveles de triglicéridos y colesterol LDL (García Rebollo *et al.*, 1998).

El análisis de isótopos estables puede aplicarse para autenticar los productos de bellota, pues la alimentación del cerdo afecta a la señal isotópica de carbono y nitrógeno en el músculo. Los animales alimentados con bellota presentan una menor riqueza relativa de ^{13}C y ^{15}N con respecto a los alimentados con pienso. La técnica discrimina bien entre productos de cerdos alimentados solo con bellota y solo con pienso, pero no distingue bien entre animales de pienso y de recebo, es decir, alimentados tanto con bellotas como con pienso (Nieto y Aguilera, 2009).

1.3.3.2. Suplementos de ácido oleico

El régimen tradicional de alimentación de los cerdos Ibéricos no siempre es posible debido a la disponibilidad de los recursos naturales, que limitan la densidad de la explotación a un cerdo por hectárea. Los cerdos Ibéricos restantes se crían en confinamiento y se les suele alimentar con dietas enriquecidas en ácido oleico suplementadas con α -tocoferol (hasta 200 mg/kg) para imitar los efectos favorables de la alimentación tradicional. Esta dieta es efectiva en cierta medida, pues los músculos de los cerdos que la reciben presentan niveles de α -tocoferol similares a los de cerdos de montanera. También se han reportado efectos positivos en los niveles de ácido oleico en los músculos de cerdos tanto Ibéricos como de genotipo industrial (Ventanas *et al.*, 2007).

En cuanto a la calidad de los productos curados, los niveles de α -tocoferol y ácido oleico también se ven incrementados en los jamones. Sin embargo, los cerdos alimentados con este tipo de dietas no alcanzan los niveles de grasa intramuscular de los cerdos Ibéricos alimentados con bellota, una seria desventaja puesto que, como ya se ha dicho, este parámetro tiene mucha

importancia para el desarrollo de numerosas cualidades sensoriales de los jamones Ibéricos (Ventanas *et al.*, 2007).

1.3.3.3. Alimentación a base de castañas

Galicia es el área principal de producción de castaña (*Castanea sativa* Mill.) en España. El uso de estas castañas en lugar de pienso comercial para alimentar a los cerdos es una forma de reducir los costes de producción y traer un producto de alta calidad a los mercados, con una grasa más sana (Domínguez *et al.*, 2015).

Según el estudio realizado por Pugliese *et al.* (2013), sustituir el pienso por una alimentación a base de castañas afecta significativamente a la calidad de la carne y la grasa. La castaña parece empeorar las características físicas de la carne, que tiene una menor capacidad de retención de agua y por lo tanto una mayor dureza, pero a cambio obtiene un mayor porcentaje de grasa intramuscular. En cuanto a los porcentaje de ácido oleico y otros ácidos grasos monoinsaturados, es mayor que en los cerdos alimentados con pienso convencional pero menor que en los cerdos Ibéricos alimentados con bellota.

2. Objetivos

- Realizar una revisión bibliográfica sobre el uso de los isótopos estables de Carbono y Nitrógeno en la trazabilidad alimentaria.
- Toma de muestras de varios productos cárnicos y preparación de dichas muestras para realizar un análisis de isótopos estables mediante E.M.R.I.
- Interpretación de los resultados de los análisis y valoración de la utilidad de la técnica para verificar la alimentación proporcionada a los animales de los que procedían las muestras.

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención de las muestras

En este estudio fueron utilizadas un total de 13 muestras de músculo (4 de pollo, 4 de cerdo y 5 de vacuno), cuyos datos se encuentran recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Información sobre las muestras de carne y abreviatura asignada a cada una de ellas

Nombre	Descripción	Detalles sobre alimentación
PoCam	Pollo con origen en Galicia, de marca Coren, con certificado Galicia Calidade	A base de maíz con un mínimo de 70% de cereales, siendo el 50% maíz, con salida libre al campo
PoBln1	Pollo con origen en Castilla y León, de marca blanca	Sin datos
PoBln2	Pollo con origen en Galicia, de marca blanca, con certificado Galicia Calidade	65% de cereales
PoPar	Pollo con origen en Galicia (Pontevedra)*	Maíz y pienso comercial compuesto mayoritariamente por soja y maíz, con salida libre al campo
TerGalS	Ternera con origen en Galicia, de marca Ternera Gallega	Lactancia materna durante un periodo mínimo de 7 meses
TerGal	Ternera con origen en Galicia, de marca Ternera Gallega	Lactancia materna, forrajes y concentrados de origen exclusivamente vegetal

TerPar	Ternera con origen en Galicia (Lugo)*	Tradicional
Año	Añojo con origen en Madrid, de marca blanca	Sin datos
Vac	Vacuno con origen en Madrid, de marca blanca	Sin datos
CerCas	Cerdo con origen en Galicia, de marca Selecta Coren, con Certificado Galicia Calidade	A base de cereales y castaña gallega, con salida al campo
CerIbe1	Cerdo Ibérico con origen en Murcia, marca Legado Ibérico de ElPozo	Pienso enriquecido con ácido oleico
CerIbe2	Cerdo Ibérico con origen en Castilla y León, de marca Cien por Cien Pata Negra	Sin datos
CerBln	Cerdo con origen en Madrid, de marca blanca	Sin datos

*=Muestras procedentes de animales de cría particular. Todas las demás fueron obtenidas en grandes superficies. La información sobre origen y alimentación se derivó del etiquetado de los alimentos y de las páginas web de Coren, ElPozo y Cien Por Cien Pata Negra.

A parte de los diferentes tipos de carne, también se analizaron muestras de castaña local (Galicia), bellota de encina local (Salamanca), hierba de un prado gallego y del maíz y el pienso con los que se había alimentado al pollo procedente de cría particular. El maíz en cuestión fue cultivado en Pontevedra utilizando únicamente estiércol como fertilizante. El pienso es de la empresa Norgasa (pienso compuesto para pollos en crecimiento) y se compone principalmente de harina de soja y maíz.

3.2. Desengrasado de la carne

Para poder analizar adecuadamente la señal isotópica en músculo este debe ser previamente desengrasado, ya que los lípidos pueden presentar una señal

diferente a la de las proteínas y si se analizasen muestras de carne con diferentes cantidades de grasa se generarían errores a la hora de interpretar los datos (Camin *et al.*, 2016).

De cada una de las carnes se extrajo una pequeña porción cuidando que estuviese lo más libre posible de grasa. Estas porciones se cortaron, con ayuda de tijeras y cuchillo en fragmentos muy pequeños con el fin de aumentar la superficie de exposición a la solución desengrasante (2 partes de metanol/1 parte de cloroformo). La carne troceada se colocó en tubos de cristal y se les añadió solución desengrasante hasta cubrir. Estos tubos se sumergieron durante 15 min en un baño de ultrasonidos tras lo cual con una jeringuilla se retiró la parte superior del líquido, en la que se acumula la grasa. Este proceso se repitió una vez, tras lo cual se añadió a los tubos un poco de agua destilada y se sumergieron 5 minutos en el baño de ultrasonidos. Esta agua fue eliminada posteriormente para que en la muestra no quedasen restos de metanol-cloroformo. Los tubos con las muestras desengrasadas se taparon con *parafilm* y se reservaron en congelador para ser después sometidas a un proceso de liofilización.

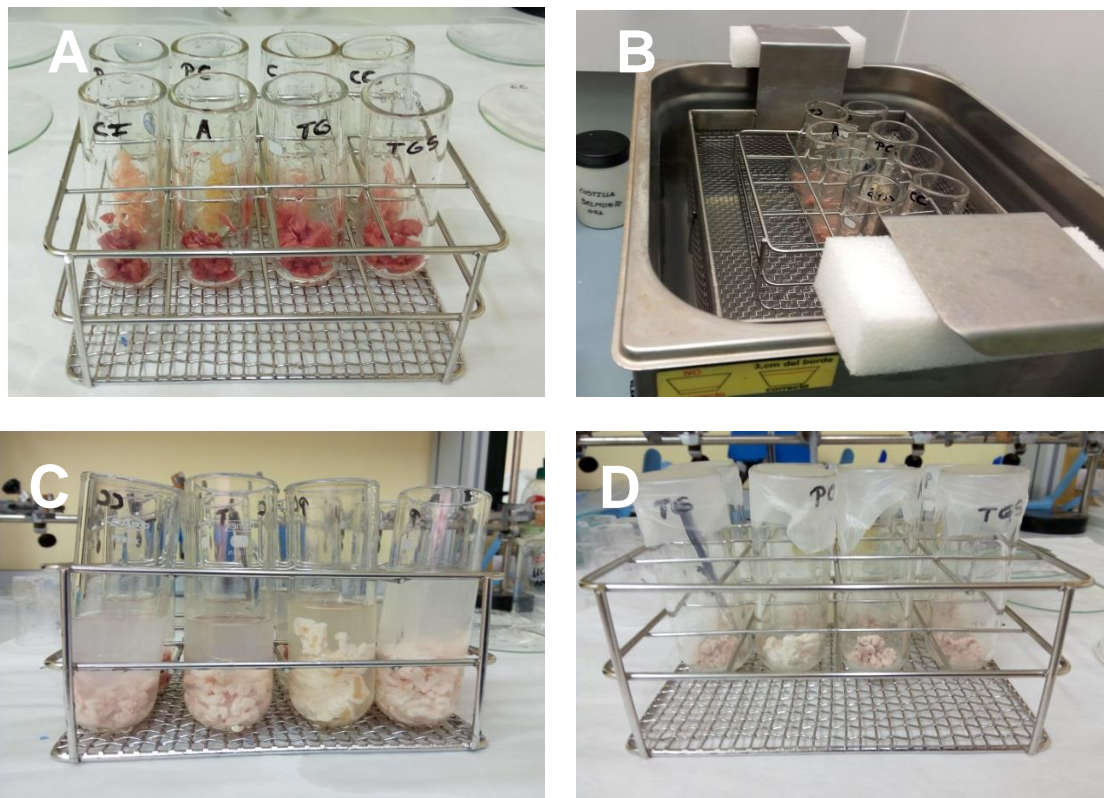


Figura 1: muestras de carne troceadas antes del desengrasado (A), baño de ultrasonidos (B), muestras de carne tras el baño (C), muestras liofilizadas (D).

3.3. Preparación de las muestras para el análisis

Con el fin de obtener muestras lo más homogéneas posible para el análisis, el maíz (que ya estaba triturado) y el pienso se pasaron por un tamiz. En cuanto a las bellotas y las castañas, se secaron en la estufa durante 24 h. Estas muestras secas y la carne liofilizada se machacaron en morteros para asegurar su homogeneización, cuidando de limpiar bien los utensilios al cambiar de muestra. A continuación se tomaron pequeñas porciones de cada homogeneizado y se colocaron en tubos Eppendorf, guardando la muestra sobrante en recipientes de plástico por si se necesitase de nuevo.

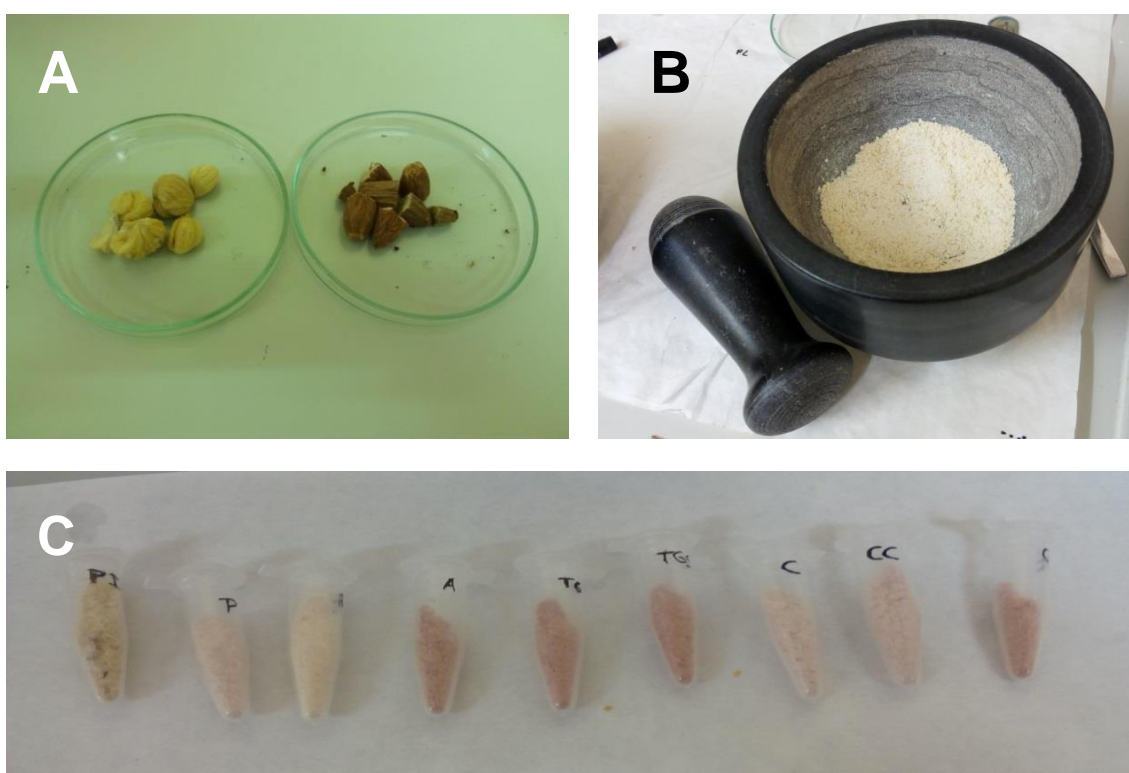


Figura 2: muestras de castaña y bellota secas (A), homogeneizado (B) y muestras listas para el análisis de isótopos estables (C)

3.4. Análisis de isótopos estables

Las muestras homogeneizadas se enviaron a la Unidad de Técnicas Instrumentales de Análisis (U.T.I.A.) de los Servicios de Apoyo a la Investigación (S.A.I.) de la U.D.C. para someterlas a un análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas. Esta técnica permite analizar las proporciones de cada isótopo de forma precisa, pudiendo detectar variaciones muy pequeñas. El elemento de interés debe estar en forma gaseosa para que el espectrómetro

pueda separar sus iones en función de las diferentes relaciones masa/carga. Esto se consigue gracias a la combustión instantánea de las muestras a altísimas temperaturas (1020° C), que rinde CO₂, N₂ y H₂O. El exceso de agua se retiene en un filtro y los dos gases generados son separados por cromatografía en el Analizador elemental FlashEA1112 (ThermoFinnigan) e introducidos en el espectrómetro de masas de relaciones isotópicas Delta^{plus} (ThermoFinnigan) a través de una interfase Confoll (ThermoFinnigan). La reproducibilidad analítica de los equipos es superior al 0,2‰ en cada uno de los isótopos estudiados.

Los resultados se obtienen en forma de la abundancia isotópica relativa de la muestra, en relación a un estándar internacional común y se expresan en unidades delta (δ), en tanto por mil (‰), según la siguiente ecuación:

$$\delta^H X = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}) - 1] * 1000$$

donde X representa el elemento, H es la masa del isótopo más pesado y R es la proporción del isótopo pesado con respecto al ligero. De esta forma, la relación isotópica ¹³C/¹²C se expresa como δ¹³C y la relación ¹⁵N/¹⁴N como δ¹⁵N. Si el valor de delta es 0, significa que la muestra tiene el mismo valor que el estándar. Si es positivo, la muestra tiene una mayor cantidad del isótopo pesado y se dice que está “enriquecida” con respecto al estándar; y si es negativo tiene una menor cantidad y estará “empobrecida” (Crawford *et al.*, 2008). Los estándares utilizados fueron los habituales en este tipo de análisis: Aire atmosférico (AIR) para el nitrógeno y VPDB para el carbono. Los análisis fueron realizados por triplicado para cada muestra. A partir de ellos se calcularon las medias y sus desviaciones típicas.

4. Resultados

En la Tabla 2 se ofrecen los resultados del análisis isotópico de las muestras estudiadas, tanto de alimentos como de músculo animal. Se muestra el valor medio de los tres análisis realizados para cada muestra. Las desviaciones típicas resultaron en su mayor parte iguales o inferiores al error analítico de los equipos. Esto es prueba de que las muestras fueron bien homogeneizadas.

Tabla 2. Valores $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ (media y desviación típica) de las muestras de carne y alimentos estudiadas

Muestra	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)
Pienso	2,0 ± 0,1	-20,0 ± 0,2
Maíz	4,1 ± 0,3	-11,8 ± 0,1
Bellota	3,0 ± 0,2	-26,2 ± 0,1
Castaña	2,6 ± 0,1	-28,6 ± 0,2
Hierba	-0,4 ± 0,4	-32,1 ± 0,1
PoCam	2,2 ± 0,0	-19,3 ± 0,1
PoBlIn1	2,1 ± 0,1	-24,9 ± 0,1
PoBlIn2	2,2 ± 0,0	-20,6 ± 0,1
PoPar	2,4 ± 0,0	-17,5 ± 0,1
TerGalls	6,1 ± 0,0	-23,2 ± 0,0
TerGall	5,3 ± 0,0	-16,9 ± 0,1
TerPar	4,2 ± 0,1	-19,6 ± 0,0
Año	7,3 ± 0,1	-21,5 ± 0,0
Vac	5,5 ± 0,1	-24,0 ± 0,1
CerBlIn	3,0 ± 0,0	-22,8 ± 0,0
Cerlbe1	6,2 ± 0,1	-21,5 ± 0,2
Cerlbe2	5,3 ± 0,0	-23,7 ± 0,1
CerCas	3,8 ± 0,0	-21,0 ± 0,1

Las muestras de vegetales y pienso presentaron un rango de valores $\delta^{13}\text{C}$ del -11,8 al 32,1‰ y $\delta^{15}\text{N}$ del -0,4 al 4,1‰. La señal isotópica de carbono en el maíz (-11,8‰) es consistente con los valores típicos de las plantas C4, que suelen oscilar entre -9 y -14‰ (Rhodes *et al.*, 2010). Las bellotas, las castañas y la hierba mostraron valores $\delta^{13}\text{C}$ más negativos (-26,2, -28,6 y -32,1‰ respectivamente) tal y como corresponde a las plantas C3, cuyos valores se encuentran normalmente entre el -24 y el -30 ‰ (Rhodes *et al.*, 2010). El

pienso tiene un valor intermedio de -20‰, en consistencia con su composición a base de soja, que también es una planta C3, y maíz.

En la señal isotópica de nitrógeno, las diferencias que se observan entre estas muestras de vegetales son normales teniendo en cuenta las distintas condiciones de crecimiento de cada planta (profundidad de las raíces, actividad microbiana en los suelos, tipos de suelo, clima, etc) (Dawson et al., 2002) y que las partes analizadas son distintas: hojas en el caso de la hierba, frutos en el caso de las demás. El valor más alto lo presenta el maíz (4,1‰), es un valor que no se sale de lo normal pero que podría estar influido porque el maíz fue cultivado en un suelo fertilizado con estiércol animal. El valor más bajo lo presenta la hierba, siendo el único valor negativo (-0,4‰). Las castañas y las bellotas presentan valores intermedios. Las bellotas son la muestra en la que el clima podría tener un efecto notable pues proceden de Salamanca, mientras que todas las demás muestras son de Galicia.

La Figura 3 muestra la relación entre los valores isotópicos de carbono y nitrógeno para las muestras de pollo, ternera y cerdo por separado, junto con sus respectivas fuentes de alimentación conocidas o supuestas. En el caso del pollo, las diferencias más grandes entre muestras se encuentran en el $\delta^{13}\text{C}$, que oscila entre -17,5 y -24,9‰. El $\delta^{15}\text{N}$ varía mucho menos, con valores comprendidos entre 2,1 y 2,4‰ (Tabla 2). En el caso de la ternera y el vacuno, los valores $\delta^{13}\text{C}$ están comprendidos entre -16,9 y -24‰. El $\delta^{15}\text{N}$ en este caso sí presenta variaciones importantes y además alcanza valores bastante más altos, disponiéndose entre 4,2 y 7,3‰ (Tabla 2). Por último en el caso de las muestras de cerdo, el $\delta^{13}\text{C}$ varía menos que en los otros casos, manteniéndose más bien bajo, con valores que van desde -21 hasta -23,7‰, mientras que el $\delta^{15}\text{N}$ varía bastante, desde 3 hasta 6,2‰ (Tabla 2).

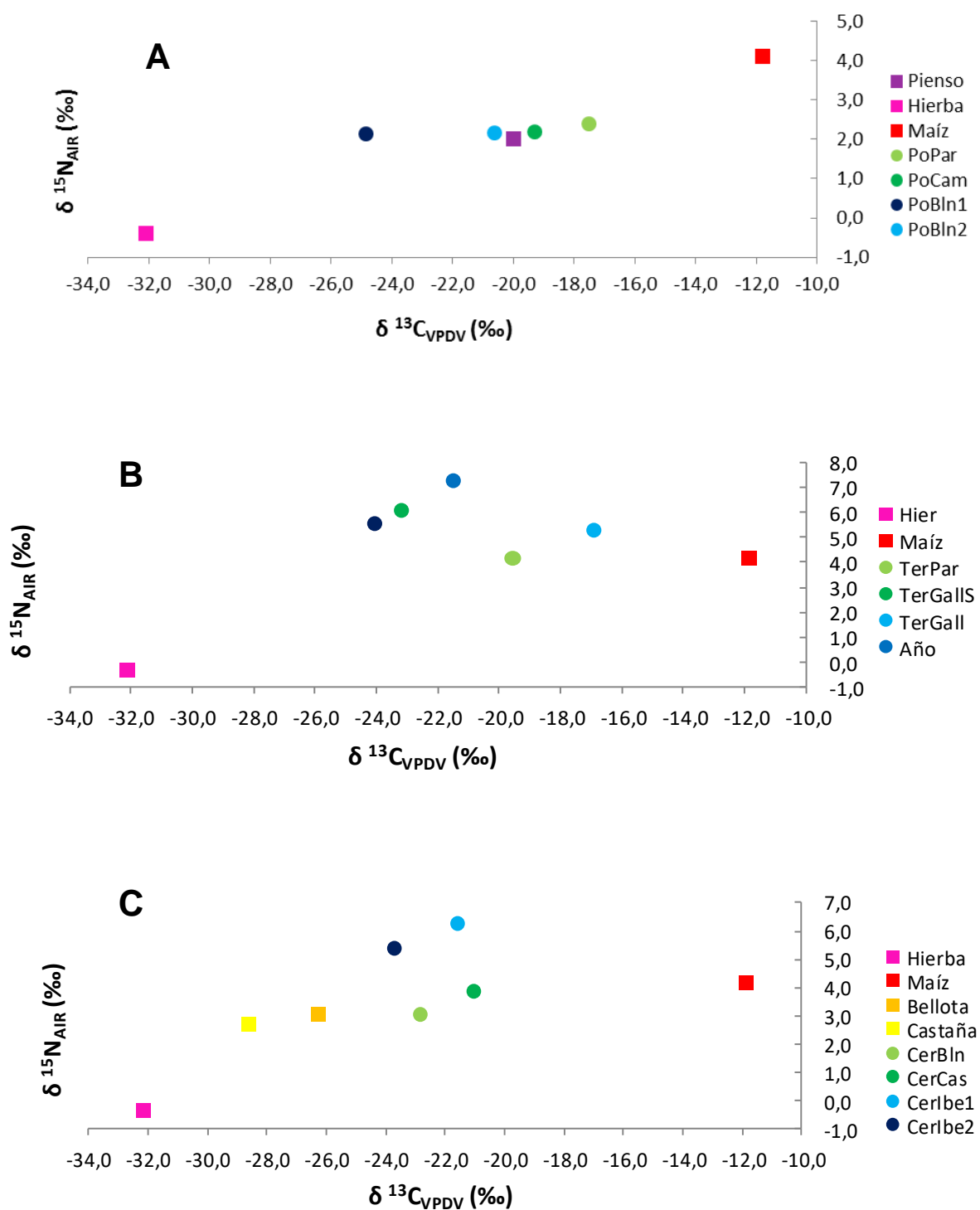


Figura 3. Gráficos $\delta^{13}C$ vs $\delta^{15}N$ de las diferentes muestras de pollo (A), vacuno (B) y cerdo (C) incluyendo en cada caso los alimentos que hayan podido influir en los valores isotópicos

5. Discusión

5.1. Pollo

El interés del estudio de las muestras de pollo es doble: por un lado, saber si los valores isotópicos reflejan la alimentación con altas proporciones de maíz que se afirma en el etiquetado de alguna de ellas. Por otro lado, ver si el manejo de los animales (de corral con salida al campo o en naves industriales/jaulas) puede detectarse en las señales isotópicas.

Observando los valores $\delta^{13}\text{C}$, el menos negativo le corresponde a PoPar (-17,3‰), que tiene un valor intermedio entre las señales isotópicas de carbono del pienso y el maíz con los que fue alimentado. Es un resultado esperable teniendo en cuenta que no se conoce con exactitud el porcentaje que representó cada tipo de alimento en su dieta. El valor de PoCam es más negativo (-19,3‰), pudiendo indicar que el pollo de Coren recibió un porcentaje menor de maíz en su dieta que el de cría particular. La información que proporciona la marca indica que sus pollos camperos se alimentan con un 50% de maíz. El valor crítico para verificar que en efecto se ha alcanzado este porcentaje es de -22,5‰ (Rhodes *et al.*, 2010), por lo que la condición parece cumplirse. Esto también permite determinar que el maíz representó más del 50% en la dieta de PoPar. De este modo ambos pollos podrían denominarse como “alimentados con maíz” sin problemas. Podría incluirse también en esta categoría a PoBln1, que como puede verse en la Figura 3 se encuentra cerca de los otros dos (con un valor de -20,6‰) pero ya no ha PoBln2, que no alcanza el valor crítico (con un valor de -24,9‰).

Observando ahora los valores $\delta^{15}\text{N}$, lo primero que destaca es que tanto PoCam como PoBln2 muestran exactamente el mismo valor (2,2‰). Esto no era esperable ya que el primero goza de salida al campo mientras que el segundo se cría en cautividad y debería presentar un valor delta menor, al no tener la posibilidad de utilizar a los invertebrados del suelo como alimento (Coletta *et al.*, 2012). PoPar, que también salía al campo, sí que presenta un valor más alto (2,4‰) pero la diferencia es tan solo del 0,2‰. El valor de PoBln1 es el más negativo (2,1‰) pero tampoco varía demasiado. En base a estos resultados, parece difícil diferenciar pollos de corral utilizando la señal de nitrógeno debido, por un lado, a la existencia de factores capaces de disminuir el $\delta^{15}\text{N}$ en los pollos camperos (como la ingestión de hierba u otros vegetales con una proporción de ^{15}N muy baja) y, por otro lado, a factores capaces de aumentar el valor en los pollos criados en cautividad, como la adición de proteína animal a la dieta, que se usa en ocasiones como sustituto de la harina de soja (fuente proteica de origen vegetal) para abaratar el coste (Carrijo *et al.*, 2006).

5.2. Vacuno

Las muestras de vacuno se estudiaron con tres objetivos: comprobar si la señal isotópica de las terneras, en especial de la Ternera Gallega, refleja que han recibido lactancia materna y verificar la eficacia de los valores isotópicos para detectar, por una parte, alimentación a base de pasto o grano y, por otra parte, la inclusión de proteína animal en la dieta.

Con respecto al $\delta^{15}\text{N}$, su valor alto en TerGalS (6.1‰) y un poco menor en TerGal (5.3‰). Estos resultados son los esperados, ya que la proporción alta de ^{15}N se identifica como una señal de la presencia de leche materna en la dieta (Jenkins *et al.*, 2001) y esta marca especifica que sus terneras la reciben, en especial la Ternera Gallega Suprema en la que el periodo de lactancia es muy largo. TerPar muestra el valor más bajo (4,2‰), pudiendo esto indicar que la duración del periodo de lactancia fue menor que en la Ternera Gallega, o que la edad de sacrificio fue mayor (dando más tiempo a que se diluyese la señal de la lactancia). Los resultados de las muestras Año y Vac son más irregulares. En el caso del añojo, el valor es desproporcionadamente alto (7.3‰). Valores $\delta^{15}\text{N}$ altos indican un nivel trófico alto (Crawford *et al.*, 2008). La señal isotópica de Año, superior incluso a la de un lactante, se acerca más a la de un animal carnívoro que a la de un herbívoro por lo que este animal tiene que haber ingerido algún tipo de proteína animal en su dieta. En el caso de Vac, el valor es similar al de TerGal (5.5‰), pero al tratarse de una muestra de vacuno, es decir, procedente de un animal adulto, el valor alto no puede explicarse con la lactancia. Vac tuvo que recibir también proteína animal aunque en una proporción bastante menor que Año.

Podría pensarse que en lugar de a esto, el valor alto de Vac se debe a una dieta rica en maíz, ya que este cereal presenta un $\delta^{15}\text{N}$ moderadamente alto en la muestra analizada en este estudio (4,1‰). Para comprobarlo hay que fijarse en la señal isotópica del carbono, que es la más influenciada por el maíz. Los datos obtenidos por Bahar *et al.*, (2005) sugieren que un valor $\delta^{13}\text{C}$ igual o mayor al -20‰ en músculo de terneras indica animales que han recibido al menos un 50% de maíz en su alimentación, y que cada incremento del 10% en la proporción de plantas C4 en la dieta resulta en un incremento del $\delta^{13}\text{C}$ muscular de aproximadamente el 1‰. El valor de $\delta^{13}\text{C}$ de Vac es menor (-24‰) y además es el más negativo en este estudio, así que, de haber comido maíz no es probable que haya sido en una cantidad suficiente para justificar el alto valor de su señal de nitrógeno. En principio, valores $\delta^{13}\text{C}$ bajos como estos indican animales que pastan, con una alimentación a base de hierba, en contraposición a los valores altos de animales con alimentación a base de grano (Kim *et al.*, 2012) pero esta posibilidad también queda descartado para Vac, porque su valor de $\delta^{15}\text{N}$ no se corresponde en absoluto con el de la hierba, que es muy bajo (-0,4‰). Sí es posible en el caso de TerGalS ($\delta^{13}\text{C} = -$

23,2‰) donde la proporción alta de ^{15}N quedó explicada por la lactancia, aunque sería su madre quien recibió una alimentación a base de pasto, quedando esto reflejado en la señal isotópica del carbono de su leche.

Los valores $\delta^{13}\text{C}$ más altos los presentan TerPar y TerGal (-19,6 y -16,9‰ respectivamente). Ambos valores se corresponden con una alimentación con más del 50% de maíz (Bahar *et al.*, 2005). En el caso de TerPar esto no desmiente que su alimentación sea de estilo tradicional, a base de grano pero también pastando, ya que su valor todavía es bastante bajo. En el caso de TerGal, el valor tampoco es del todo inesperado puesto que la marca especifica que parte de su alimentación son concentrados de origen vegetal que muy probablemente llevarán maíz.

5.3. Cerdo

A pesar de que las directrices legales (B.O.E. del 11 de Enero de 2014) referidas a la denominación de los distintos tipos de alimentación suministrada a los cerdos ibéricos obligan a un correcto etiquetado de los productos procesados (jamón, lomo u otros embutidos), no es obligatorio incluir esta información en la carne fresca comercializada, quedando a voluntad del productor. Esto conlleva la posibilidad de que el consumidor obtenga una idea equivocada sobre el producto que adquiere, ya que no se puede distinguir mediante el etiquetado si los animales proceden de montanera o recebo, o por el contrario fueron alimentados solo con piensos.

En primer lugar se analizó la posibilidad de que Cerlbe2, del que efectivamente no se ofrecían datos claros sobre la dieta ni en la etiqueta ni en la página web de la marca, haya recibido una alimentación a base de bellota. El valor $\delta^{13}\text{C}$ de esta muestra es el más negativo (-23,7‰) pero, la diferencia con el valor de la bellota (-26,2‰) es mayor del 1‰, que sería el fraccionamiento isotópico normal si el animal hubiese recibido bellota exclusivamente. Su valor $\delta^{15}\text{N}$ (5,1‰) supone un fraccionamiento del 2‰ con respecto al valor de la bellota, que representa el límite mínimo para poder considerar la alimentación a base de esta (Crawford *et al.*, 2008). En el estudio de De Pedro Sanz *et al.*, (2008), los animales de montanera presentaron valores $\delta^{15}\text{N}$ bastante menores que Cerlbe2, siendo de 3,78‰ cuando la bellota en la dehesa era abundante y de 4,17‰ cuando era escasa. Todavía más bajo es el $\delta^{15}\text{N}$ obtenido por Nieto y Aguilera, (2008), de 2,57‰ para los cerdos de montanera y tampoco coincide el valor que obtuvieron de $\delta^{13}\text{C}$, que fue más negativo (-25,62‰), bastante más cerca del valor de la bellota. En vista a todos estos datos, cabe descartar a Cerlbe2 como cerdo de montanera, pero no puede afirmarse que no haya recibido bellota en absoluto.

Los cerdos ibéricos alimentados con pienso presentan valores $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ mayores que los de animales de montanera (Nieto y Aguilera, 2008). Cerlbe1,

que fue alimentado a base de pienso enriquecido con ácido oleico, presenta efectivamente valores más positivos ($\delta^{13}\text{C} = -21,5\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N} = (6,2\text{‰})$) con respecto a los cerdos de montanera de los estudios anteriormente citados. El valor tan alto de nitrógeno parece ser característico de los cerdos alimentados con este tipo de pienso enriquecido pues coincide con los valores hallados por De Pedro Sanz *et al.*, (2008) en cerdos que recibieron piensos elaborados con harina de girasol alto oleico.

Poco se puede decir de CerBln al no contar con ningún dato concreto sobre su alimentación. Su valor $\delta^{15}\text{N}$ (3‰) es inferior al mostrado por cerdos ibéricos alimentados con pienso comercial (Nieto y Aguilera, 2008; De Pedro Sanz *et al.*, 2008) pero al no tratarse de un cerdo ibérico los valores podrían no ser comparables. El valor $\delta^{13}\text{C}$ (-22,8‰) indica que si este cerdo hubiese sido alimentado a base de pienso, este contendría una mayor proporción de plantas C3 que C4.

Por último, con respecto al cerdo Selecta de Coren alimentado con castañas (CerCas), su valor $\delta^{13}\text{C}$ (-21‰) es mucho mayor que el de la castaña (-28,6‰), mientras que su valor $\delta^{15}\text{N}$ aumenta tan solo un 1,2‰ con respecto al del de la castaña. No existe literatura previa sobre el efecto en la señal isotópica de la inclusión de castañas en la dieta de mamíferos. Solo cabe interpretar el fraccionamiento isotópico que sucede entre las castañas y el músculo según los valores generales, es decir, incremento del 1‰ en el $\delta^{13}\text{C}$ y del 2-4‰ en el $\delta^{15}\text{N}$ (Crawford *et al.*, 2008), que distan mucho de cumplirse en este caso. Una posible explicación es que además de la castaña en la dieta de este cerdo fueran incluidos alimentos que aumentan la proporción de ^{13}C , como el maíz, y alimentos que disminuyen la de ^{15}N , como la hierba. Esto se correspondería con la información proporcionada por la empresa, que especifica que parte de la dieta de estos cerdos está compuesta por cereales y que se crían en pequeñas explotaciones con salida al campo.

6a. Conclusiones

El análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno en muestras de músculo ha resultado ser una técnica útil para verificar la información proporcionada a los consumidores sobre la alimentación de los animales estudiados en este trabajo, aunque no en todos los casos.

La señal isotópica del carbono parece ser razonablemente fiable a la hora de verificar si los pollos han recibido una dieta a base de maíz. También parece servir para determinar, siempre que se cuente también con la señal del nitrógeno, si el ganado vacuno ha sido alimentado con pasto, gracias a los valores $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ tan bajos que presenta la hierba. La señal isotópica del nitrógeno parece especialmente útil para verificar la señal de la leche materna

en la Ternera Gallega, y también permite detectar la alimentación con proteína animal en el ganado vacuno. En cambio, no permite diferenciar claramente a los pollos con salida al campo de pollos criados en cautividad, debido a la existencia de numerosos factores que podrían llevar a error, como el bajo valor de la hierba o la inclusión de proteína animal en la dieta.

En el caso de los productos cárnicos de cerdo, es difícil determinar de forma concluyente que los animales hayan recibido bellota o castaña utilizando las señales isotópicas de carbono y nitrógeno, a menos que dichos alimentos hayan constituido la mayor parte de su dieta, y este no parece ser el caso de ninguna de las muestras analizadas en este estudio. A pesar de ello, el método parece ser fiable para diferenciar los productos de cerdo ibéricos de montanera, que son los más valorados, de los de cebo o recebo.

En general, el análisis de los isótopos estables tiene potencial en el campo de la trazabilidad alimentaria para diferentes tipos de productos cárnicos, y sería interesante realizar futuros estudios aumentando el número de muestras y con un mayor control sobre la alimentación y las condiciones de cría de los animales.

6b. Conclusions

Analysis of stable isotopes of carbon and nitrogen in muscle samples was a useful tool to verify the information provided to the consumers about the feeding of the animals studied in this work, but not in all cases.

The isotopic signature of carbon seems fairly reliable to verify the authenticity of corn-fed chicken. It also seems useful, in combination with the nitrogen signature, to determine if neat have been grass-fed, thanks to the low $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of grass. The isotopic signature of nitrogen seems especially useful to verify breastfeeding in *Ternera Gallega* and also allows detection of animal protein feeding in older beef animals. In return, it doesn't permit a clear discrimination between free-ranged and barn chicken because there are a number of factors that can lead to misinterpretation of the data, like the low value of grass or the inclusion of animal protein in the commercial feeds.

As for the pork meat products, it seems difficult to accurately verify feeding of acorn or chesnut using the isotopic signatures of carbon and nitrogen, unless these feeds make up the biggest part of the diet, and this doesn't seem to be true for any of the samples analyzed in the present work. In spite of it, the method seems to discriminate well between Iberian *montanera* pigs products (the most appreciated ones) from *cebo* or *recebo* products.

In general, stable isotope analysis has potential in the field of alimentary traceability for a variety of meat products, so it would be interesting to carry on

further research increasing the number of samples and with a better control over the feeding and raising conditions of the animals.

7a. Bibliografía

- Bahar, B., Monahan, F. J., Moloney, A. P., O'Kiely, P., Scrimgeour, C. M. y Schmidt, O. (2005). Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 1937-1942.
- Camin, F., Bontempo, L., Perini, M. y Piasentier, E. (2016). Stable isotope ratio analysis for assessing the authenticity of food of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15, 868-877.
- Carrijo, A. S., Pezzato, A. C., Ducatti, C., Sartori, J. R., Trinca, L. y Silva, E. T. (2006). Traceability of bovine meat and bone meal in poultry by stable isotope analysis. *Brazilian Journal of Poultry Science* 8 (1), 63-68.
- Coletta, L. D., Pereira, A. L., Coelho, A. A. D., Savino, V. J. M., Menten, J. F. M., Correr, E., França, L. C. y Marinelli, L. A. (2012). Barn vs. free-range chickens: Differences in their diets determined by stable isotopes. *Food Chemistry* 131, 155–160.
- Crawford, F., McDonald, R. A. y Bearhop, S. (2008) Applications of stable isotope techniques to the ecology of mammals. *Mammal Review* 38, 87-107.
- Dawson, T.E., Mambelli, S., Plamboeck, A.H., Templer, P.H., Tu, K.P. (2002). Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33, 507-559.
- De Pedro Sanz, E., Huertas, A. D., Reyes, E. y Olmo, J. G. (2008). Determinación del régimen de alimentación de cerdos ibéricos mediante técnicas de análisis de isótopos. *Albéitar* 113, 8-11.
- De Smet, S., Balcaen, A., Claeys, E., Boeckx, P. & Van Cleemput, O. (2004). Stable carbon isotope analysis of different tissues of beef animals in relation to their diet. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 1227-1232.
- Domínguez, R., Martínez, S., Gómez, M., Carballo, J. y Franco, I. (2015). Fatty acids, retinol and cholesterol composition in various fatty tissues of Celta pig breed: effect of the use of chestnuts in the finishing diet. *Journal of Food Composition and Analysis* 37, 104-111.
- Fernández, A., de Pedro, E., Núñez, N., Silió, L., García-Casco, J. y Rodríguez, C. (2003). Genetic parameters for meat and fat quality and carcass composition traits in Iberian pigs. *Meat Science* 64, 405–410.

- García, A. J., Macía, E., Ortiz A., Morales, P. J., Martín M., Fallola, A., Mena, P. y Campillo, J. E. (1998). Effects of consumption of meat product reach in monoinsaturated fatty acids (the ham from the Iberian pig) on plasma lipids. *Nutrition research* 18, 743-750.
- Jenkins, S. G., Partridge, S. T., Stephenson, T. R., Farley, S. D. y Robbins, C. T. (2001). Nitrogen and carbon isotope fractionation between mothers, neonates, and nursing offspring. *Oecologia* 129, 336-341.
- Kim, S.-H., Cruz, G. D., Fadel, J. G. y Clifford, A. J. (2012). Food authenticity using natural carbon isotopes (^{12}C , ^{13}C , ^{14}C) in grass-fed and grain-fed beef. *Food Science and Biotechnology* 21 (1), 295-298.
- Lorenzo, J. M., Franco, D. y Carballo, J. (2014). Effect of the inclusion of chestnut in the finishing diet on volatile compounds during the manufacture of dry-cured 'Lacón' from Celta pig breed. *Meat Science* 96, 211-223.
- Nieto, R. y Aguilera, J. F. (2009). Uso del análisis del carbono y del nitrógeno en la trazabilidad de productos derivados del cerdo ibérico. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* 22 (1), 105-124.
- Osorio, M. T., Moloney, A. P., Schmidt, O. y Monahan, F. J. (2011). Beef authentication and retrospective dietary verification using stable isotope ratio analysis of bovine muscle and tail hair. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 3295-3305.
- Pugliese, C., Sirtori, F., Ruiz, J., Martin, D., Parenti, S. y Franci, O. (2009). Effect of pasture on chestnut or acorn on fatty acid composition and aromatic profile of fat of Cinta Senese dry-cured ham. *Grasas y Aceites* 60 (3), 271-276.
- Rhodes, C. N., Lofthouse, J. H., Hird, S., Rose, P., Reece, P., Christy, J., Macarthur, R., Brereton, P. A. (2010). The use of stable carbon isotopes to authenticate claims that poultry have been corn-fed. *Food Chemistry* 118, 927-932.
- Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza de Vaca, M., Vázquez, F. M. y Cava, R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the "montanera" feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. *Food Chemistry* 124, 997-1004.
- Temperan, S., Lorenzo, J. M., Castiñeiras, B. D., Franco, I. y Carballo, J. (2014). Carcass and meat quality traits of Celta heavy pigs. Effect of the inclusion of chestnuts in the finishing diet. *Spanish Journal of Agricultural Research* 12 (3), 694-707.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C. y Estévez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for

the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science* 77, 246-256.

7b. Webgrafía

- www.coren.es
- www.elpozo.com
- www.cienporcienpatanegra.com