

LAS TÉCNICAS ISOTÓPICAS Y SUS RECIENTES APLICACIONES EN LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS

Julián Gamboa-Delgado
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias
Biológicas, Programa Maricultura, Departamento de Ecología.

RESUMEN

Diversas técnicas analíticas han sido utilizadas en todas las disciplinas de la biología para generar un conocimiento más claro sobre algún fenómeno en particular. Un grupo de estas metodologías analíticas migró lentamente desde las ciencias geológicas hacia las ciencias biológicas. Tales metodologías están basadas en la determinación de las firmas isotópicas naturales presentes en diversos tipos de materiales, tanto inorgánicos como orgánicos. La mayoría de los elementos químicos que conforman la materia están presentes como dos o más isótopos. La única diferencia entre un isótopo de un mismo elemento y otro, es el número de neutrones, lo cual le otorga una masa ligeramente diferente a cada isótopo. Los isótopos estables han sido ampliamente utilizados como marcadores nutricionales no-peligrosos para estimar la forma en la cual nutrientes y energía son movilizados en los ecosistemas. De igual forma, las técnicas pueden usarse para determinar las rutas migratorias de varias especies y más recientemente han sido de gran utilidad en estudios nutricionales enfocados a evaluar nuevos ingredientes. La ciencia forense de los alimentos también ha utilizado técnicas isotópicas para detectar productos adulterados o falsos. El presente manuscrito muestra una breve revisión de las aplicaciones de los isótopos estables en diversas disciplinas de la biología, enfatizando aquellas áreas en las cuales existe un incremento importante de generación de conocimiento basado en estas técnicas.



Palabras clave: Isótopos estables, técnicas analíticas, biología, ecología trófica, nutrición animal, trazabilidad de productos.

INTRODUCCIÓN

Los isótopos pueden definirse como formas químicas diferentes de un mismo elemento; por ejemplo, el carbono tiene dos isótopos estables (el C12, muy abundante en la naturaleza, y el C13, más escaso) y un isótopo radioactivo (C14). La única diferencia entre un isótopo de un mismo elemento y otro isótopo, reside en el número de neutrones presentes en el núcleo. Debido a su abundancia natural en los diversos tejidos animales y vegetales, el carbono y el nitrógeno son los elementos más frecuentemente analizados para determinar sus proporciones isotópicas (expresadas como $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$).

Los isótopos pesados y ligeros participan en todas las reacciones metabólicas y a pesar de que las diferencias de masa entre isótopos pesados y ligeros son minúsculas, resultan perfectamente detectables por medio de técnicas analíticas (espectrometría IRMS).

En vista de que los elementos químicos (y sus isótopos) se encuentran ampliamente distribuidos por la litosfera, atmósfera y biósfera, estos han sido muy útiles para trazar nutrientes. Una ventaja adicional es que los isótopos más pesados tienden a acumularse en los tejidos de los animales consumidores, lo cual hace que las firmas isotópicas de sus tejidos sean diferentes a sus alimentos o a los de otros animales. En otras palabras, la dieta de un organismo define el valor isotópico de ese organismo y de sus tejidos. Estudios recientes han aplicado técnicas isotópicas para definir los alimentos preferidos por animales silvestres y para evaluar en laboratorio nuevos ingredientes destinados a la nutrición animal (Gamboa-Delgado *et al.*, 2016; Phillips, 2012).

En vista de que cada animal y planta conservan sus propias firmas isotópicas y estas son influenciadas por las condiciones de cultivo o crianza, otra serie

de estudios se enfocan sobre la medición de firmas isotópicas para verificar que diversos productos de origen animal y vegetal realmente sean producidos de la forma que indica el empaque (producto silvestre, de granja, de agricultura orgánica, etc.) (Gamboa-Delgado *et al.*, 2014; Serrano *et al.*, 2007; Vinci *et al.*, 2013).

Por otro lado, la alta sensibilidad de la técnica ha apoyado varios estudios médicos orientados a la detección de afecciones estomacales. Por ejemplo, la detección de la bacteria *Helicobacter pylori* en el tracto digestivo puede realizarse por medio de determinaciones isotópicas. En este tipo de diagnóstico, el paciente ingiere un sustrato marcado con isótopos estables específicos (carbono pesado, o C^{13}) y si la bacteria está presente, ésta consume el sustrato y los productos de degradación generados ($^{13}\text{CO}_2$) son detectados en el aire exhalado por el paciente (Delvin *et al.*, 1999).

ISÓTOPOS ESTABLES Y APLICACIONES EN ECOLOGÍA

El uso de isótopos estables como trazadores nutricionales representa una poderosa herramienta para estimar flujos de nutrientes y energía dentro de los ecosistemas terrestres y acuáticos (Abrantes y Sheaves, 2010). Diversos organismos animales y vegetales tienden a tener valores isotópicos diferentes; por ejemplo, las plantas presentan valores isotópicos de nitrógeno muy bajos, mientras que los animales herbívoros que se alimentan de estas plantas tienden a acumular los isótopos pesados que estaban en las plantas, y en general, los animales herbívoros presentan valores isotópicos en sus tejidos que son 3 unidades mayores que las plantas consumidas.

De igual forma, los depredadores de estos herbívoros, a su vez, aumentan el valor isotópico de sus tejidos en otras 3 unidades (Figura 1). Estas diferencias han permitido aplicar una gran cantidad de estudios sobre alimentación de especies silvestres y es posible determinar qué es lo que prefiere comer cierto organismo y se apoya la determinación de su posición en las pirámides alimenticias.

Técnicas isotópicas se han aplicado también para reconstruir la dieta de animales extintos al analizar los valores isotópicos de hueso y colágeno, para después asociarlos a los valores presentes en diversos frutos, granos, tejidos animales, etc. La estructura poblacional de ciertos ecosistemas se ha visto fuertemente afectada por la introducción de especies no nativas y en este contexto, los análisis basados en isótopos han arrojado interesante información acerca de que es lo que consume la nueva especie introducida, con quien compete y/o a quien la depreda (Caut *et al.*, 2008).

Una aplicación muy reciente de los isótopos en ecología es la determinación de rutas migratorias. Por ejemplo, se han realizado estudios con la mariposa monarca en los cuales se mide la firma isotópica de las alas de las mariposas, las cuales no cambian su valor isotópico una vez alcanzado el estado adulto. Después de las migraciones, se mide la firma isotópica y se compara con las firmas

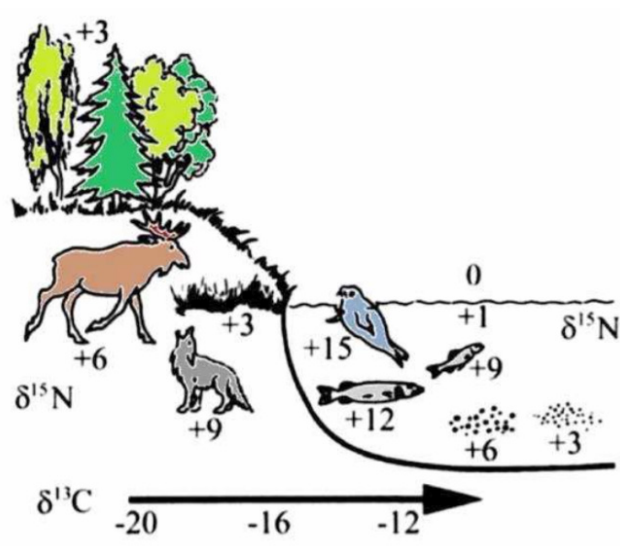


Figura 1. Diferencias isotópicas del nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$, partes por mil) y carbono ($\delta^{13}\text{C}$) constituyentes de animales y vegetales en diferentes ecosistemas y niveles tróficos. Tomado de Salazar-García (2009).

isotópicas de las plantas consumidas en estado de oruga. Como estas plantas se encuentran en regiones muy definidas, es posible trazar una migración hasta su origen. Estudios similares se han realizado con plumas de varias especies de aves que presentan largas migraciones (Zimmo *et al.*, 2012).

USO DE METODOLOGÍAS ISOTÓPICAS EN ESTUDIOS SOBRE NUTRICIÓN

Existe un dicho popular que dice "somos lo que comemos"; esto es particularmente verdadero cuando se considera a los isótopos estables, es decir, los isótopos de los elementos presentes en los alimentos terminan ya sea en los tejidos de los consumidores o participando en diversas funciones metabólicas. Si a una persona vegetariana se le analizan los isótopos estables de nitrógeno en cabello, tendrían un valor muy diferente al determinado en las personas que mantienen una dieta predominantemente basada en carne. Gracias a que los diversos alimentos (cereales, granos, carne, frutos) pueden exhibir firmas isotópicas naturalmente distintas, es posible establecer una relación entre un organismo consumidor y su dieta.

Estos valores pueden integrarse en modelos matemáticos (Phillips y Gregg, 2001; Fry, 2006) para determinar cuáles son los alimentos que más contribuyen al crecimiento de un animal o de una población de animales. Tales técnicas se han aplicado en estudios de ecología trófica y han sido de amplia utilidad para la nutrición animal porque permiten estimar la contribución al crecimiento que aportan nuevos ingredientes en comparación a ingredientes tradicionales.

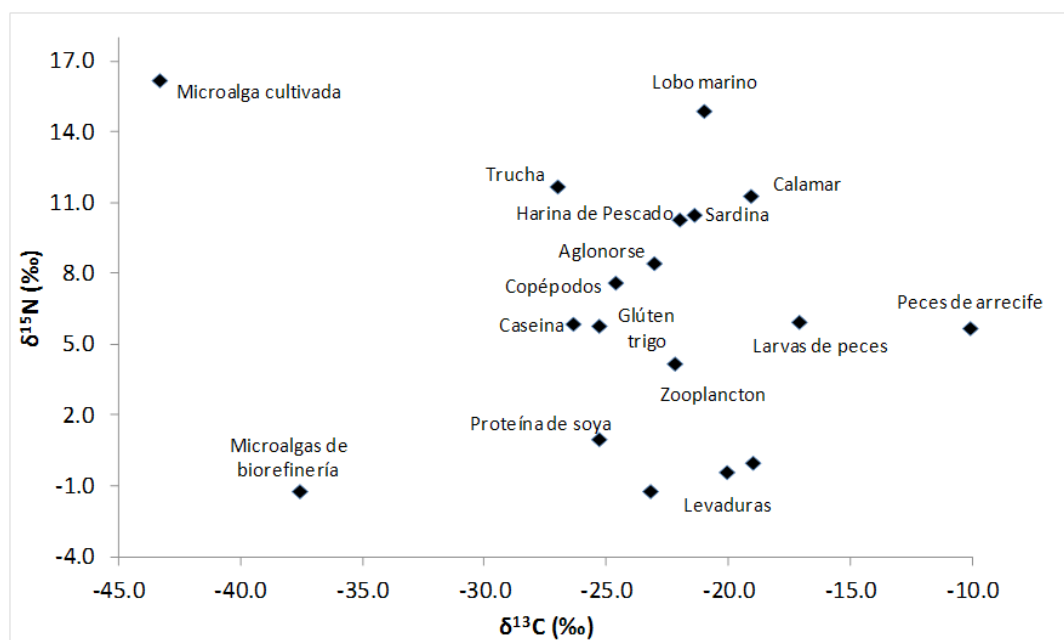
De forma similar, otras aplicaciones se orientan a la investigación acerca de las dinámicas de nutrientes en diversos ambientes acuáticos y terrestres. Mientras que, en condiciones de laboratorio, han sido de utilidad para cuantificar la incorporación de nutrientes en animales muy pequeños en los cuales otras técnicas no se pueden aplicar para investigar el consumo de alimento. Por ejemplo, en la crianza de animales acuáticos que tienen valor comercial ya sea como alimento u ornamentales, muchas empresas requieren criar larvas de peces y crustáceos. Estas larvas presentan un tamaño extremadamente pequeño y en este contexto, la aplicación de técnicas isotópicas en estudios de nutrición larval ha sido muy útil porque se requiere un tamaño de muestra muy pequeño (1 mg) y porque las técnicas otorgan una alta sensibilidad. En animales planctónicos, ha sido

posible estimar tasas de ingestión y asimilación tan bajas como 2.5 nanogramos de carbono por individuo por hora (Verschoor *et al.*, 2005).

La firma isotópica de un animal silvestre refleja el perfil isotópico del material dietario que fue asimilado y usado para construir nuevos tejidos, por lo tanto, es posible determinar los aportes al crecimiento que proveen los nutrientes de una dieta. Como se mencionó antes, diversos animales, plantas y sus productos, presentan diferentes valores isotópicos de forma natural (Figura 2). Ésta característica ha sido de utilidad para diseñar estudios nutricionales en los cuales es posible evaluar nuevos ingredientes que tienen diferentes valores isotópicos, lo cual permite eventualmente evaluar el valor isotópico de animales alimentados con estos para determinar cuál(es) de los ingredientes aportan menor o mayor cantidad de nutrientes al crecimiento.

Estudios recientes se han enfocado en aplicar técnicas isotópicas en organismos acuáticos de valor comercial con el fin de comparar la asimilación de la proteína aportada por nuevos ingredientes de origen microbiano en comparación con las fuentes animales tradicionales, como lo es la harina de pescado (Gamboa-Delgado & Márquez-Reyes, 2016).

Figura 2. Valores isotópicos de carbono y nitrógeno ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) determinados en diversos organismos y productos derivados de estos. Debido a que los isótopos pesados tienden a acumularse conforme se asciende en las pirámides tróficas, los valores más positivos se encuentran arriba a la derecha y corresponden a organismos depredadores. Las microalgas cultivadas presentan valores extremos debido a las propiedades químicas (e isotópicas) de los fertilizantes y dióxido de carbono suplementario usados para su producción.



APLICACIONES DE LOS ISÓTOPOS ESTABLES EN FISIOLÓGÍA ANIMAL

El metabolismo de las proteínas ha sido ampliamente estudiado como un medio para entender y mejorar el proceso de crecimiento en los animales de crianza (Carter *et al.*, 1994). Los isótopos estables pueden ser utilizados como indicadores confiables para determinar la incorporación de la proteína dietaria en un tejido. El metabolismo de las proteínas también ha sido evaluado utilizando trazadores a base de isótopos estables como una alternativa a los isótopos radioactivos.

Estudios sobre síntesis proteica realizados en trucha han demostrado que los resultados obtenidos utilizando isótopos estables son similares a aquellos generados mediante el uso de aminoácidos radio-marcados (Houlihan *et al.*, 1995). La tasa de incorporación de un nutriente (en un tejido específico u organismo completo) también puede ser estimada mediante la medición de los cambios isotópicos que ocurren en algún tejido (músculo, cabello, escamas, plumas, etc.) al alimentar a los animales experimentales con dietas conocidas (Pearson *et al.*, 2003). De esta

forma, se obtiene un indicador adicional del desempeño nutricional debido a que los tejidos de animales que exhiben crecimiento rápido también incorporan rápidamente la señal isotópica de los ingredientes o dieta consumida.

Lo anterior ha sido muy útil para estimar eficiencias de asimilación en estudios en laboratorio enfocados a probar ingredientes alternativos para especies marinas (Tabla 1).

ISÓTOPOS ESTABLES COMO HERRAMIENTAS EN LA DETECCIÓN DE PRODUCTOS FRAUDULENTOS

El actual mercado de productos alimenticios alcanza una escala global sin precedentes. Distinguir el origen o el método de producción de un producto que ya se encuentra en el mercado requiere de

protocolos de trazabilidad que generalmente no se aplican, lo cual conlleva a prácticas fraudulentas. La descripción errónea y deliberada en el etiquetado de diversos productos alimenticios es un problema

Tabla 1. Ejemplos de eficiencias de asimilación de diferentes tipos de biomasa microbiana (BM) evaluada como sustituto de la harina de pescado (HP) en dietas experimentales para camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Los datos muestran las proporciones relativas de proteína suministrada por cada tipo de ingrediente al crecimiento. Estimaciones basadas en lecturas isotópicas del nitrógeno contenido en ingredientes y en tejido animal al final de los bioensayos.

| | Proporción en la dieta (%) | | Contribución al crecimiento (%) | | Referencia |
|---|----------------------------|-----------|---------------------------------|------------|--------------------------------------|
| | HP | BM | HP | BM | |
| Levadura <i>Torula Candida utilis</i> | 70 | 30 a | 73 | 27 a | Gamboa-Delgado et al. 2016 |
| Microalgas <i>Spirulina + Nannochloropsis</i> | 33 | 33a 33 | 36 | 50 b 14 | Gamboa-Delgado et al. datos no publ. |
| Microalgas <i>Grammatophora</i> | 90 | 10 a | 93 | 7 a | Pacheco-Vega et al. en prensa |
| <i>Schizochytrium</i> | 90 | 10 a | 92 | 8 a | |
| Harina de bioflóculos | 50 | 50 a | 59 | 41b | Gamboa-Delgado et al. 2017 |

* Los superíndices indican diferencias significativas entre los valores esperados (proporciones de proteína de cada ingrediente en las dietas) y los valores observados (estimados en camarones) contribuidos al crecimiento.

frecuente y extendido en el cual se ofrece un producto animal que no corresponde al indicado en los empaques. De igual forma, diferenciar productos derivados de pesquerías (sujetos a vedas temporales) o de prácticas de cultivo es difícil y existen varios métodos subjetivos que no son fiables, tales como la coloración, textura y palatabilidad del producto. Una diferenciación puede realizarse al **identificar** y medir un trazador químico específico como lo es el perfil de ácidos grasos o la firma isotópica del producto (Moretti et al., 2003).

La relativamente nueva ciencia forense de los alimentos (Primrose et al., 2010) ha empleado un rango de técnicas isotópicas emergentes, las cuales han permitido I) detectar la adulteración de productos tales como vino y miel de abeja (Cabañero et al., 2008; Kropf et al., 2010), II) identificar productos farmacéuticos falsos (Felton et al., 2011), III) diferenciar entre la producción convencional u orgánica de plantas y animales (Bell et al., 2007; Flores et al., 2007), IV) identificar los métodos de producción (Rogers, 2009; Vinci et al., 2013) y V) autenticar el origen geográfico de alimentos (Zhang et al., 2012).

Varios estudios han aplicado técnicas isotópicas para diferenciar la forma de producción de aves, peces y hortalizas. Por ejemplo, la adulteración de la miel de abeja es una práctica muy común en nuestro país. Se agrega jarabe de maíz bajo el argumento que esto evita la cristalización, sin embargo, se trata de una dilución del producto que ocurre de forma cotidiana. Varios países han adoptado técnicas isotópicas para detectar si los lote de miel importados son puros, o si presentan alguna adulteración. El principio es muy simple: generalmente, las abejas solamente generan miel a partir de productos obtenidos de plantas con flores varaderas, las cuales tienen valores isotópicos diferentes a las plantas gramíneas con

espiga (caña de azúcar y jarabes derivados). En otro tipo de investigación para diferenciar productos, un estudio reciente realizado en dos países demostró que se puede distinguir claramente entre camarones extraídos de altamar (sujetos a vedas temporales y posibles prohibiciones de importación) de aquellos animales producidos por acuicultura (Gamboa-Delgado et al., 2014). Las metodologías isotópicas incluso presentan potencial para apoyar los protocolos de trazabilidad y verificación del modo de producción del producto camarón, el cual es fomentado por nuevas normas oficiales (NOM-047-PESC-2012) (COFEMER. 2013).

ISÓTOPOS ESTABLES COMO TRAZADORES DE CONTAMINACIÓN

Los isótopos estables también han sido utilizados para determinar las dinámicas de nutrientes en que ocurren en suelos dedicados a la agricultura y ganadería, así como en los efluentes derivados de estanques de producción acuícola (Bombeo-Tuburan et al., 1993; Epp et al., 2002). Mediante el análisis isotópico de los componentes de cierto alimento para animales, es posible realizar un trazado de nutrientes desde los alimentos hasta los cuerpos de agua o los sedimentos cercanos al presunto sitio contaminante (Yokoyama et al., 2006).

En operaciones de cultivo de camarón, isótopos estables han sido aplicados mediante la formulación de dietas enriquecidas con nitrógeno pesado con el fin de generar productos metabólicos trazables desde las granjas de producción y hacia los efluentes que se vierten, frecuentemente sin tratamiento, hacia los diversos ecosistemas.

CONCLUSIONES

Las determinaciones isotópicas se han vuelto más comunes y asequibles debido a la presencia de un creciente número de laboratorios ofreciendo análisis de isótopos estables. De igual forma, algunos investigadores que trabajan en disciplinas biológicas han encontrado diversas ventajas y formas de aplicación para las técnicas isotópicas, las cuales no son ofrecidas por otras técnicas analíticas. Un gran número de aplicaciones actuales más refinadas incluyen el marcaje de componentes o precursores biológicos específicos con isótopos estables pesados para posteriormente trazar estos componentes hacia diferentes tejidos e incluso células individuales. Un compuesto de interés puede separarse en subunidades más pequeñas (por ejemplo, por medio de cromatografía) y estas subunidades pueden ingresarse directamente en los espectrómetros IRMS para determinar los valores isotópicos individuales en aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, etc.

La facilidad de manipular los valores isotópicos de las plantas y sus productos por medio de nutrientes y medios de cultivo específicos, amplía el alcance de futuros estudios sobre fisiología y nutrición animal. Existe una gran variedad de ingredientes de origen vegetal, microbiano y animal que muestran un alto potencial para ser evaluados nutricionalmente usando isótopos estables debido a los contrastantes valores isotópicos que estas fuentes presentan de forma natural.

La creciente adopción del uso de análisis isotópicos, representa una oportunidad para trazar nutrientes y contaminantes en el medio natural, mientras que otra serie de estudios desarrollados en laboratorio se enfoca en la detección de productos alimenticios adulterados y fármacos falsos. Estas últimas aplicaciones presentan un significativo crecimiento y es posible prever la creación de centros de autenticación de productos en los cuales las técnicas isotópicas jueguen un papel central.



LITERATURA CITADA

- Abrantes, K.G., M. Sheaves. 2010.** Importance of freshwater flow in terrestrial-aquatic energetic connectivity in intermittently connected estuaries of tropical Australia. *Marine Biology* 157: 2071-2086. DOI: 10.1007/s00227-010-1475-8
- Bell, J., T. Preston, J. Bron, R.J. Henderson, F. Strachan, K. Cooper, D.J. Morrison. 2007.** Discrimination of wild and cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using chemical and isotopic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(15): 5934-5941. DOI: 10.1021/jf0704561
- Bombero-Tuburan, I., N.G. Guanzon, Jr., G.L. Schroeder. 1993.** Production of *Penaeus monodon* (Fabricius) using four natural food types in an extensive system. *Aquaculture* 112: 57-65. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90158-U](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90158-U)
- Cabañero, A.I., J.L. Recio, M. Rupérez. 2008.** Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22: 3111-3118. doi: 10.1002/rcm.3711
- Carter, C.G., S.F. Owen, Z.Y. He, P.W. Watt, C. Scrimgeour, D.F. Houlihan, M.J. Rennie. 1994.** Determination of protein synthesis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, using a stable isotope. *Journal of Experimental Biology* 189: 279-284. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9317802>
- Caut, S., E. Angulo, F. Courchamp. 2008.** Dietary shift of an invasive predator: rats, seabirds and sea turtles. *Journal of Applied Ecology* 45:428-437. 10.1111/j.1365-2664.2007.01438.x
- COFEMER. 2013.** Comisión Federal de Mejora Regulatoria. Dictamen final sobre el anteproyecto denominado Norma Oficial Mexicana NOM-047-PESC-2012 para la identificación del origen de camarones cultivados, de aguas marinas y esteros, marismas y bahías. 14 pp. http://207.248.177.30/expediente/v99/_COFEME.13.0292.pdf [accessed 1 July 2013].
- Delvin, E.E., J.L. Brazier, C. Deslandres, F. Alvarez, P. Russo, E. Seidman. 1999.** Accuracy of the (¹³C)-urea breath test in diagnosing *Helicobacter pylori* gastritis in pediatric patients. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 28:59-62. http://journals.lww.com/jpgn/Abstract/1999/01000/Accuracy_of_the_13C_Urea_Breath_Test_in.14.aspx
- Epp, M.A., 2002.** Stable isotopes in shrimp aquaculture. *World Aquaculture* 33: 18-19.
- Felton, L.A., P.P. Shah, Z. Sharp, V. Atudorei, G.S. Timmins. 2011.** Stable isotope-labeled excipients for drug product identification and counterfeit detection. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 37: 88-92. doi:10.3109/03639045.2010.492397
- Flores, P., J. Fenoll, P. Hellin. 2007.** The feasibility of using ¹⁵N and ¹³C values for discriminating between conventionally and organically fertilized pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5740-5745. DOI: 10.1021/jf0701180
- Fry, B. 2006.** *Stable Isotope Ecology*. Springer Science. Nueva York, USA, 390 pp.
- Gamboa-Delgado, J., J.M. Márquez-Reyes. 2016.** Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Reviews in Aquaculture*. In press. doi: 10.1111/raq.12157
- Gamboa-Delgado, J., B. Fernández-Díaz, M.G. Nieto-López, L.E. Cruz-Suárez. 2016.** Nutritional contribution of torula yeast and fish meal to the growth of shrimp *Litopenaeus vannamei* as indicated by natural nitrogen stable isotopes. *Aquaculture* 453: 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.026>
- Gamboa-Delgado, J., C. Molina-Poveda, D.E. Godínez-Siordia, D. Villarreal-Cavazos, D. Ricque-Marie, L.E. Cruz-Suárez. 2014.** Application of stable isotope analysis to differentiate shrimp extracted by industrial fishing or produced through aquaculture practices. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 71(10): 1520-1528. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0005>
- Gamboa-Delgado, J., G.A. Rodríguez Montes de Oca, J.C. Román-Reyes, D. Villarreal-Cavazos, M. Nieto-López, L.E. Cruz-Suárez. 2017.** Assessment of the relative contribution of dietary nitrogen from fish meal and biofloc meal to the growth of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research* 48: 2963-2972. DOI: 10.1111/are.13129
- Houlihan, D.F., Carter, C.G., McCarthy, I.D. 1995.** *Protein turnover in animals*. Chapter 1. En: Nitrogen metabolism and excretion. Walsh, P.J. y P. Wright (Eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, pp. 1-31
- Kropf, U., T. Golob, M. Nečemer, P. Kump, M. Korošec, J. Bertoneclj, N. Ogrinc. 2010.** Carbon and nitrogen natural stable isotopes in Slovene honey: adulteration and botanical

and geographical aspects. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58: 12794-12803. doi:10.1021/jf102940s.

Moretti, V.M., G.M. Turchini, F. Bellagamba. 2003. Traceability issues in fishery and aquaculture products. *Veterinary Research Communications* 27: 497-505. doi:10.1023/B:VERC.0000014207.01900.5c.

Pearson, S.F., D.J. Levey, C.H. Greenberg, C. Martínez del Río. 2003. Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia* 135: 516-523. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1221-8>

Phillips, D.L. 2012. Converting isotope values to diet composition: the use of mixing models. *Journal of Mammalogy* 93: 342-352. <https://academic.oup.com/jmammal/article-lookup/doi/10.1644/11-MAMM-S-158.1>

Phillips, D.L., J.W. Gregg. 2001 Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* 127: 171-179. (see also erratum, *Oecologia* 128: 204). doi:10.1007/s004420000578

Primrose, S., M. Woolfe, S. Rollinson. 2010. Food forensics: Methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology* 21: 582-590. doi:10.1016/j.tifs.2010.09.006.

Rogers, K.M. 2009. Stable isotopes as a tool to differentiate eggs laid by caged, barn, free range, and organic hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4236-4242. DOI:10.1021/jf803760s

Serrano, R., M.A. Blanes, L. Orero. 2007. Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues from the western Mediterranean. *Chemosphere* 69(7): 1075-1080. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.034.

Salazar-García, D.C. 2009. Interrogando a los muertos mediante isótopos estables. OrJIA (eds.) Actas de las II Jornadas de Jóvenes en Investigación Arqueológica (Madrid, 6, 7 y 8 de mayo de 2009). JIA 2009, Tomo II pp: 587-593. https://www.academia.edu/4650774/Interrogando_a_los_muertos_mediante_is%C3%B3topos_estables

Verschoor, A., H. Boonstra, T. Meijer. 2005. Application of stable isotope tracers to studies of zooplankton feeding, using the rotifer *Brachionus calyciflorus* as an example. *Hydrobiologia* 546: 535-549. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F1-4020-4408-9_54

Vinci, G., R. Preti, A. Tieri, S. Vieri. 2013. Authenticity and quality of animal origin food investigated by stable-isotope ratio analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(3): 439-448. doi:10.1002/jsfa.5970.

Yokoyama, H., K. Abo, Y. Ishihi. 2006. Quantifying aquaculture-derived organic matter in the sediment in and around a coastal fish farm using stable carbon and nitrogen isotope ratios. *Aquaculture* 254, 411-425. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.024>

Zhang, L., J. Pan, C. Zhu. 2012. Determination of the geographical origin of Chinese teas based on stable carbon and nitrogen isotope ratios. *Journal of Zhejiang University- Science B* 13: 824-830. doi: 10.1631/jzus. B1200046

Zimmo, S. J. Blanco, S. Nebel. 2012. The use of stable isotopes in the study of animal migration. *Nature Education Knowledge* 3(12): 3. <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-use-of-stable-isotopes-in-the-96648168>