



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 326 249**

⑫ Número de solicitud: 200702710

⑮ Int. Cl.:
G01N 30/72 (2006.01)
B01D 59/44 (2006.01)
G01N 33/12 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **16.10.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
05.10.2009

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Salamanca
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca, ES**

⑱ Inventor/es: **Recio Hernández, Clemente**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Método de identificación de productos alimenticios.**

㉒ Resumen:
Método de identificación de productos alimenticios de origen animal, según la dieta de dicho animal, caracterizado por el análisis de la relación isotópica natural de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los ésteres metílicos de ácidos grasos de muestras de grasas. Los productos alimenticios a identificar pueden ser de origen porcino de cebo, recebo o bellota.

ES 2 326 249 A1

DESCRIPCIÓN

Método de identificación de productos alimenticios.

5 La presente invención se refiere a un método de identificación de productos alimenticios de origen animal, según la dieta de dicho animal, caracterizado por el análisis de la relación isotópica natural de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los ésteres metílicos de ácidos grasos de las muestras obtenidas. Más particularmente, se refiere a un método para identificar productos derivados del cerdo, de acuerdo con la dieta del animal: cebo, recebo ó bellota.

10 Estado de la técnica anterior

La diferencia, en relación a la calidad, de los productos alimenticios de origen animal, por ejemplo carne, leche, huevos o cualquiera de sus derivados, dependiendo de la raza o de los distintos tipos de alimentación que puede recibir el animal, es considerablemente grande.

15 En particular, el aumento en la demanda de productos de calidad derivados concretamente del cerdo ibérico ha dado lugar a un aumento continuado de producción que no ha ido en paralelo con un aumento similar de los recursos disponibles. De hecho, el hábitat natural -La Dehesa- se ha reducido, obligando, en gran medida, al abandono de los hábitos de cría y engorde tradicionales. Las características de sabor y efectos beneficiosos para la salud de estos productos están íntimamente ligadas a los métodos tradicionales de cría y alimentación en montanera, pero la dehesa no es ya capaz de mantener la densidad de animales que el mercado demanda, incentivando pues que cada vez más animales sean alimentados de forma artificial.

25 Ante esta disyuntiva, el consumidor reclama métodos objetivos para diferenciar los productos derivados de animales alimentados en regímenes diferentes. Las autoridades en España han respondido a la demanda concreta de cerdos ibéricos con legislación nacional (RD 1083/2001, modificado por RD 144/2003 y 1781/2004) que establece normas de calidad, y clasifica los productos derivados del cerdo ibérico en las categorías conocidas de "Pienso (o "Cebo")", "Recebo" y "Bellota", atribuyendo una pieza determinada a una u otra categoría según se detalla en la Orden PRE/3844/2004, que establece los métodos oficiales en España de toma de muestra y análisis.

30 Los productores, por su parte, buscan una alimentación que produzca características que se ajusten a los parámetros analíticos esperables según la Orden PRE/3844/2004, de modo que es posible encontrar en el mercado piensos con grasas añadidas cuyo perfil de ácidos grasos intenta adaptarse al que sería típico de una alimentación "natural".

35 Actualmente, existen métodos para caracterizar y diferenciar productos de cerdo ibérico en función de su dieta. Alguno de esos métodos están basados en que las relaciones isotópicas del C total en un animal reflejan su dieta (cfr. ES2100130A1; González. Martín, I., 1999, *Meat Sci.*, vol. 52, pp. 437-441), aunque el empleo de piensos formulados con ciertas grasas animales puede confundir los resultados finales de la caracterización de estas muestras.

40 Explicación de la invención

En la presente invención se emplean técnicas CSIC ("Compound Specific Isotopic Characterization"), que son muy útiles para determinar la alimentación recibida por el animal, y así proporcionar un perfil de ácidos grasos difícilmente enmascarables sobre todo en animales alimentados con piensos formulados con ciertas grasas animales. La caracterización isotópica de compuestos específicos separados por cromatografía de gases, combustión y análisis de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, da lugar a un "perfil" isotópico ("fingerprint") que es característico de cada muestra, y por tanto mas difícil de enmascarar.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificación de productos alimenticios de origen animal, según la dieta de dicho animal, que comprende:

- a. la extracción de muestras de grasas del producto alimenticio y la obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) de dichas muestras de grasa. Estas muestras de grasa pueden ser de cualquier parte adecuada del animal y más preferentemente del tejido adiposo subcutáneo;
- b. la separación de los FAMES del paso (a);
- c. combustión o pirólisis de los FAMES del paso (b); y
- d. análisis mediante espectrometría de masas de la relación isotópica natural de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los productos obtenidos en paso (c).

Una realización preferida del método de la invención, comprende la separación del paso (b) por cromatografía de gases.

65 Otra realización preferida del método de la invención comprende el uso de un espectrómetro de masas de fuente gaseosa y de tipo flujo continuo para el análisis de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la muestra.

Otra realización más preferida del método de la invención comprende la determinación de al menos cuatro FAMES, saturados o insaturados, comprendidos dentro del rango C12:0 a C20:1. Para obtener un mejor rendimiento del método de la invención, la selección de estos FAMES va a depender del tipo de producto alimenticio a analizar y de su origen (es decir, de la procedencia animal del producto).

El producto alimenticio de la invención es de origen animal, preferentemente, pero sin limitarse, a animales de origen vacuno, bovino, porcino o avícola. Más preferiblemente el origen del alimento es porcino.

El término “producto alimenticio” significa en esta descripción cualquier alimento, como por ejemplo, pero sin limitarse a la leche, carne, huevos o cualquiera de sus derivados. Preferiblemente, el producto alimenticio es de origen porcino y puede ser, pero sin limitarse a, jamón curado, caña de lomo, paleta o embutidos.

Cuando el alimento es de origen porcino, pueden existir tres posibles tipos de alimento según la dieta del cerdo. Así, la clasificación de los productos alimenticios derivados del cerdo, se puede dividir en: cebo (para animales alimentados con pienso), recebo (animales alimentados con pienso y bellota) o bellota (alimentados solamente con bellota).

Otra realización más preferida del método de la invención comprende la determinación de al menos los siguientes FAMES: ácido oleico, palmítico, linoleico y esteárico. Estos cuatro FAMES serían los mínimos imprescindibles para proporcionar una información de identificación positiva en el caso de un cerdo ibérico de bellota, pero se pueden determinar más FAMES que afinarían aún más el método de la invención, como por ejemplo el ácido mirístico (C14:0) y el gadoleico (C20:1), y en general cualquier FAME del rango C12:0 a C20:1 o cualquiera de sus combinaciones.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1.- Muestra una muestra en lámina según los criterios de la Orden PRE/3844/2004, y otras tres paralelas a cuero y magro del animal.

Fig. 2.- Representa valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en los ésteres metílicos del ácido oléico (C18:1) representados frente a los correspondientes del ácido palmítico (C16:0).

Fig. 3.- Representa valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en los ésteres metílicos del ácido oleico (C18:1) representados frente a los correspondientes del ácido esteárico (C18:0).

Fig. 4.- Representa valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en los ésteres metílicos del ácido oléico (C18:1) representados frente a los correspondientes del ácido linoleico (C18:2).

Fig. 5.- Representa valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en los ésteres metílicos del ácido palmítico (C16:0) representados frente a los correspondientes del ácido esteárico (C18:0).

Fig. 6.- Representa valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en los ésteres metílicos del ácido palmítico (C16:0) representados frente a los correspondientes del ácido linoleico (C18:2).

Fig. 7.- Representa valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en los ésteres metílicos del ácido esteárico (C18:0) representados frente a los correspondientes del ácido linoleico (C18:2).

Fig. 8.- Representa valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ del colágeno obtenido de la parte central del fémur de jamones clasificados en distintas categorías, bellotas y piensos. En bellotas y piensos, los valores corresponden a la “muestra total”, sin separar fracciones.

Fig. 9.- Representa medias de valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en los ésteres metílicos de los ácidos palmítico (C16:0; Fig. 9A.), oléico (C18:1; Fig. 9B), esteárico (C18:0; Fig. 9C) y linoleico (C18:2; Fig. 9D) en las distintas variedades consideradas.

Fig. 10.- Representa funciones discriminantes canónicas principales correspondientes a las muestras consideradas.

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de método de la invención.

Ejemplo 1

1.- Muestras

5 Se procedió al análisis de $\delta^{13}\text{C}$ en una serie de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) obtenidos según lo indicado en la Orden PRE/3844/2004 (Orden PRE/3844/2004, de 18 de noviembre, por la que se establecen los métodos oficiales de toma de muestras en canales de cerdos ibéricos y el método de análisis para la determinación de la composición de ácidos grasos de los lípidos totales del tejido adiposo subcutáneo de cerdos ibéricos), aplicados a
 10 grasa extraída mediante microondas (cfr. De Pedro *et al.*, 1996, *Meat Sci.*, vol. 45, pp. 45-51) a partir de muestras de cerdos clasificados en distintas categorías por la D.O. Guijuelo (Denominación de origen de Guijuelo).

Las muestras fueron facilitadas, debidamente precintadas, por el CRDO “Guijuelo” (Consejo Regulador de la denominación de origen de Guijuelo).

15 En conjunto se trataron 159 muestras de grasa, facilitadas por el CRDO “Guijuelo” debidamente precintadas, correspondientes, según certifica dicho CRDO:

- un lote de 28 muestras de cerdos blancos alimentados con pienso (Blanco Pienso ó B. Pienso);
- 20 - un lote de 18 muestras de cerdos ibéricos de pienso (Ibérico pienso ó 10 lb. Pienso);
- un lote de 25 muestras de cerdos de recebo (31 lb. Recebo);
- un lote de 18 muestras de cerdos de recebo (32 lb. Recebo);
- 25 - un lote de 14 muestras de cerdos de recebo (33 lb. Recebo);
- un lote de 10 muestras de cerdos de bellota (65 lb. Bellota);
- 30 - un lote de 23 muestras de cerdos de bellota (66 lb. Bellota);
- un lote de 23 muestras de cerdos de bellota (67 lb. Bellota).

35 Sobre las muestras facilitadas por el CRDO “Guijuelo”, obtenidas en matadero de acuerdo con los criterios establecidos en la ORDEN PRE/3844/2004, y siguiendo las indicaciones allí recogidas, se procedió a la obtención de láminas y tiras perpendiculares a cuero-magro (Fig. 1). Hasta el momento de ser procesadas, todas las muestras se conservan congeladas a -20°C.

40 Adicionalmente, se analizaron las grasas extraídas, según métodos oficiales españoles (RD 609/1999), de dos variedades comerciales de pienso para cerdos -una exclusivamente a base de cereales (Pienso L); la otra con grasas animales añadidas (Pienso N)-, así como bellotas de encina (10, de diferentes procedencias geográficas) y alcornoque (2).

45 Las muestras de la alimentación de los cerdos se obtuvieron por donación en fábricas de piensos, o por recolección personal en el caso de las bellotas, en zonas tradicionales de cría de cerdo Ibérico de las provincias españolas de Salamanca, Sevilla y Córdoba.

50 2.- Obtención de la grasa

La obtención de grasa a partir del tejido adiposo de los cerdos se llevó a cabo sobre aprox. 5 gr de tejido obtenido de las tiras previamente descongeladas, utilizando el método del horno de microondas, operado en condiciones similares a las establecidas por De Pedro *et al.* (cfr. De Pedro *et al.*, 1996, *Meat Sci.*, vol. 45, pp. 45-51). La grasa fundida fue
 55 filtrada a través de filtros de celulosa con un diámetro de poro de 20-25 μm (Whatman # 41 o equivalente), y, si no se va a procesar de inmediato, se almacena en congelador.

Por otro lado, la obtención de grasa a partir de bellotas y piensos se llevó a cabo sobre 15 gr (bellotas) a 25 gr (piensos) de muestra previamente molida a tamaño “polvo analítico”. La muestra así homogeneizada fue sometida a extracción usando éter de petróleo como disolvente en un extractor Soxhlet automático marca Gerhardt, mod. Soxtherm, operado a $T = 150^\circ\text{C}$ durante 30 mins. Tras la extracción, el disolvente se eliminó en un rotavapor a 45°C , y la grasa se filtró y se recogió. Al igual que con la procedente de tejido adiposo, si no se va a analizar de inmediato, se conserva en congelador.

65 En el caso de las bellotas se obtuvieron por separado las grasas correspondientes a bellotas peladas y sin pelar, a fin de investigar si pudiera haber diferencias isotópicas.

3.- Metilación

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se obtuvieron sobre 85 mgr de la grasa previamente extraída en el paso anterior, que fueron disueltos en 4 ml de n-hexano. A la solución se añadieron 200 μ l de la solución metilante, constituida por una solución 2M de KOH en metanol. Tras agitar la mezcla, se dejó reposar 30 minutos, al cabo de los cuales se centrifugó a 2000 rpm durante 30" (seg.). Parte de la solución centrifugada se transfirió a un vial de 2 ml, con tapón de septa; el resto se descartó. Si la solución no va a ser analizada de inmediato, se conserva en congelador.

4.- Análisis Isotópico

La determinación isotópica $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}\text{‰}$ se realizó en un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas de fuente gaseosa y flujo continuo, modelo IsoPrime[®], fabricado por Micromass (actualmente, GV Instruments, Ltd.), equipado con electroimán, caja de gases de referencia (simple o doble) y filtro electrostático (para D/H), así como con el correspondiente sistema de toma de datos. Las condiciones de funcionamiento del espectrómetro son las establecidas por el fabricante de dicho aparato.

Entre los diversos sistemas de preparación disponibles para acoplar al espectrómetro de flujo continuo se encuentra el cromatógrafo de gases (GC). Este equipo permite la determinación selectiva y precisa de los valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y δD en los componentes individuales de matrices complejas. La interfase entre cromatógrafo y espectrómetro puede ser configurada para combustión o pirólisis. La sensibilidad del equipo permite determinaciones de la relación isotópica en cantidades de gas tan pequeñas como 0,5 nM C. El sistema hace uso de cromatografía capilar para separar los componentes individuales a partir de matrices diversas. Los componentes individuales, así separados, pueden ser dirigidos al detector del cromatógrafo (FID), o bien al espectrómetro de masas, de modo que es posible admitir al espectrómetro, a través de la unidad de combustión, sólo los compuestos de interés. Las sustancias en cuestión se transforman en CO_2 en el horno de combustión, y el agua, subproducto de la misma, es atrapada por medios criogénicos o de membrana semipermeable.

Las muestras se admiten en forma líquida, disueltas en hexano, y pueden ser inyectadas manualmente, o mediante un muestreador automático para líquidos. Las condiciones de funcionamiento del cromatógrafo de gases son las establecidas por el fabricante. El equipo utilizado para separar los FAMES y transferirlos al espectrómetro fue un cromatógrafo de gases Agilent GC System 6890 Series Plus+ para separar compuestos orgánicos individuales a partir de una matriz compleja; producir CO_2 a partir de cada componente individual y determinar la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en un espectrómetro de masas ISOPRIME de flujo continuo.

La separación de los FAMES objeto de interés se realizó en el equipo indicado, empleando una columna capilar "Forte BPX70" de SGE, de 30 m; 0,32 mm ID y 0,25 mm de espesor de fase, utilizando He como gas portador. La temperatura de inyector y detector fue de 280°C. Normalmente los análisis de muestra desconocida se llevaron a cabo en condiciones split 25:1. Los materiales de referencia, sin embargo, se analizaron en condiciones split 4:1.

Este programa de cromatografía permite la correcta separación y análisis isotópico de los FAMES C13:0 a C21:0.

Los análisis se llevaron a cabo en lotes de 18 muestras, precedidas y seguidas por una muestra de referencia. De cada muestra se inyectaron al cromatógrafo 1 μ l. La rutina de inyección tuvo un programa de lavado de la jeringa inmediatamente anterior e inmediatamente posterior a la inyección de la muestra.

5.- Materiales de referencia

A efectos de normalizar los resultados existen numerosos materiales de referencia certificados por la IAEA (Agencia Internacional de la Energía Atómica). Sin embargo, la distribución de estos materiales está limitada a una unidad cada tres años, y tanto la IAEA como NIST (National Institute of Standards and Technology; organismo oficial norteamericano en cuestiones relacionadas con los estándares y la normalización) recomiendan encarecidamente la preparación de estándares internos, calibrados sobre los materiales internacionales de referencia.

En consecuencia, se utilizaron como materiales de referencia primarios NBS-22, un crudo cuyo $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -30,03\text{‰}$, USGS-24 (grafito; $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -16,45\text{‰}$) e IAEA-CH-6 (sucrosa; $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -10,45\text{‰}$). El análisis conjunto de estos materiales con tres FAMES obtenidos comercialmente (Metil-tridecanoato, Metil-heneicosanoato y Metil-heptadecanoato, de Sigma-Aldrich) nos permitió caracterizar éstos isotópicamente. Una vez caracterizados, su disolución en hexano y mezcla en iguales proporciones nos aportó un material de referencia interno con unos valores isotópicos adecuados y en una forma equivalente a las muestras desconocidas.

Adicionalmente, se usaron como elemento de control las referencias "Mixture A" y "Mixture B" de la Univ. de Indiana (Arndt Schimmelmman, Ph.D. Dept. of Geol. Sciences, Biogeochem. Laboratories).

6.- Normalización de resultados

El valor isotópico obtenido de los pasos anteriores se expresa en términos de la notación “ δ ”, donde el valor δ representa el exceso, normalmente del isótopo pesado, en una muestra problema respecto al gas de referencia, en unidades por mil, según:

$$\delta(\text{‰}) = \frac{R_{\text{Sam}} - R_{\text{Ref}}}{R_{\text{Ref}}} \times 1.000$$

donde R_{Sam} y R_{Ref} son las relaciones entre la intensidad mínima (“minor beam”) y la máxima (“major beam”) medidas en el instrumento.

En la Fig. 2., se observan los valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en los ésteres metílicos del Ac. Oléico (C18:1) representados frente a los correspondientes del Ac. Palmítico (C16:0). Ninguna de las muestras calificadas como “de bellota” tiene valores de $\delta^{13}\text{C}$ (C18:1) > -26,88‰.

Los valores isotópicos medidos en el espectrómetro son valores referidos al gas de referencia utilizado en cada momento. Para convertir estos valores en valores δ referidos a VPDB (Vienna - Pee Dee Belemnite; la referencia internacional para datos de $\delta^{13}\text{C}$) se utilizó la expresión:

$$\delta_{\text{VPDB}} = \delta_m + \delta_{\text{VPDB}}^{\text{Ref}} + \frac{\delta_m * \delta_{\text{VPDB}}^{\text{Ref}}}{1000}$$

donde δ_{VPDB} es el valor isotópico referido a VPDB; δ_m es el valor determinado en el espectrómetro respecto al gas de referencia; y $\delta_{\text{VPDB}}^{\text{Ref}}$ es el valor isotópico del gas de referencia respecto al standard internacional (VPDB).

En términos prácticos, esta normalización se ha llevado a cabo empleando los valores determinados para los estándares internos analizados conjuntamente con las muestras desconocidas, utilizando las hojas de cálculo, modificadas a partir de las del Dr. Paul Brooks (Center for Stable Isotope Biogeochemistry; Univ. of California at Berkeley).

7.- Resultados

En este experimento se observó (ver Figs. 2 a 7) que hay 4 ácidos grasos que están presentes en todas las muestras de forma abundante, con otros presentes en menor proporción. Los cuatro ácidos grasos siempre presentes, en orden relativo de abundancia, son: Oleico (C18:1), Palmítico (C16:0), Linoleico (C18:2) y Esteárico (C18:0), y los FAMES de estos ácidos fueron los utilizados para diferenciar el tipo de alimentación aportada al animal. El ácido Mirístico (C14:0) está ausente en todas las muestras de los lotes clasificados como “de bellota”, congruente con su ausencia en las propias bellotas.

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en FAMES están representados en las Figs. 2 a 7.

El ácido Oleico (C18:1) es un buen discriminante del tipo de alimentación aportada al animal, de modo que todas las muestras procedentes de cerdos clasificados como “de bellota” tienen valores muy bajos de $\delta^{13}\text{C}$ C18:1; siempre inferiores a -26,88‰, lo cual está en concordancia con el hecho de que los valores isotópicamente mas ligeros que se han medido son aquellos correspondientes a las bellotas (Figs. 2 a 4).

Las bellotas tienen siempre los valores más bajos de $\delta^{13}\text{C}$, cualquiera que sea el FAME considerado. Aunque, el número de datos es limitado, parecería que hay variaciones tanto geográficas (las de Salamanca son las más ligeras, haciéndose mas pesadas hacia el Sur de la Península Ibérica) como específicas (las de encina son isotópicamente más ligeras que las de alcornoque). En cualquier caso, esto no afecta a las conclusiones que se pudieran obtener referentes a la alimentación de los cerdos, pues son siempre muy ligeras.

También se puede observar, que existen marcadas diferencias isotópicas entre los piensos (Figs. 2, 4, 6). El “Pienso N”, con grasas animales añadidas, tiene FAMES con valores de $\delta^{13}\text{C}$ muy parecidos a los de la bellota; el “Pienso L”, exclusivamente a base de cereales, es isotópicamente más pesado.

La observación conjunta de los cuatro ácidos grasos considerados hace que el cerdo ibérico alimentado con pienso sea fácilmente diferenciable del de bellota o el de recebo (Figs. 2 a 7).

Además, se observó que los animales pertenecientes a cada uno de los lotes de recebo han recibido muy diferente alimentación. Las muestras correspondientes al lote “33 Ibérico Recebo” son sistemáticamente las más pesadas desde el punto de vista isotópico, cualquiera que sea el parámetro considerado. Esta diferencia puede ser atribuida a una menor reposición en montanera, unida al hecho de que el pienso utilizado puede haber tenido una elevada proporción de granos derivados de plantas C4 (como por ejemplo, maíz. De hecho, el análisis, en condiciones análogas, de muestras

comerciales de aceite de maíz destinado a consumo humano da lugar a valores comparables a los obtenidos para “33 lb Recebo”). Los datos isotópicos de FAMEs permiten pues no sólo diferenciar el tipo de alimentación, sino también obtener una idea semicuantitativa de la proporción relativa de aportes en los casos en que estos han sido variados. Esta variabilidad no es rara, como manifiesta la ocasional distribución bimodal (evidente al proyectar los datos en forma de histograma) dentro de un mismo lote, lo que apuntaría hacia la mezcla de animales con diferente régimen alimenticio en una misma partida para sacrificio.

Las técnicas CSIC, utilizadas en este ejemplo, y sus resultados isotópicos aplicados a las grasas reflejan la alimentación del animal en un periodo determinado de ganancia de peso previa al sacrificio del animal. Este es un período suficientemente amplio en la vida del animal, según el real decreto en España RD 1083/2001, para la clasificación de los alimentos derivados del cerdo en cebo, recebo y bellota.

Por otro lado, si se quiere obtener información que abarque períodos más amplios; esencialmente toda la vida del animal posterior al destete, podría ser preciso analizar componentes de órganos que se acumulen de forma continuada. En este sentido, las proteínas del hueso (colágeno) pueden ser un objetivo adecuado. Por su condición de proteína el colágeno contiene N además de C, por lo que es posible determinar conjuntamente $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$.

En la Fig. 8 se observan, pues, los valores obtenidos en el colágeno extraído del fémur de 15 jamones correspondientes a 6 marcas comerciales diferentes (PM, LP, PNCM, JS, HH y OPC), así como los valores, en muestra total, de algunas bellotas y los piensos anteriormente mencionados. Las muestras PM, LP y PNCM fueron adquiridas como “de bellota”; JS corresponde a jamones “ibéricos de recebo”, y HH son muestras de cerdos ibéricos alimentados a pienso. OPC son muestras adquiridas como “jamón de bodega”, procedentes pues de cerdos blancos. En bellotas y piensos, los valores corresponden a la “muestra total”, sin separar fracciones.

En general, es ampliamente aceptado que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ del animal reflejan los de su dieta (mas $\approx 1\text{‰}$; DeNiro, MJ. Epstein, S., 1978 *Geochim. Cosmochim.*, vol. 42, pp. 495-506), mientras que $\delta^{15}\text{N}$ del animal es entre 1 y 3‰ más pesado que el de su dieta (con un incremento medio próximo al 3‰ siendo lo más frecuente; DeNiro, MJ. Epstein, S., 1981 *Geochim. Cosmochim.*, vol. 45, pp. 341-351; Minagawa, M. Wada, E. 1984, *Geochim. Cosmochim.* vol. 48, pp. 1135-1140; Vanderklift, M.A. Ponsard, S., 2003 *Oecologia*, vol. 136, pp.169-182). En este contexto, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ determinados (Fig. 8) son excesivamente pesados; incluso más pesados que los atribuidos a cerdos alimentados a pienso por González-Martín *et al.* (1999), aunque ellos analizaron lípidos, siempre isotópicamente más ligeros que las proteínas analizadas para este estudio, cuyos valores suelen considerarse equivalentes al valor medio total del organismo), indicando un componente importante derivado de plantas C4 en la alimentación de los cerdos, lo cual es particularmente evidente en una de las muestras PNCM. En contraste, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ son más ligeros de lo que sería esperable si la bellota hubiera sido un componente relevante de una “dieta natural”, pero son compatibles con una alimentación esencialmente a base de piensos.

8.- Tratamiento estadístico de los resultados

Los datos normalizados fueron sometidos a análisis exploratorio, que confirmaba la diferencia de medias de valores isotópicos correspondientes a los ácidos grasos considerados (Fig. 9 y Tabla 1). Las medias de C18:1 de las bellotas y de los cerdos con ellas alimentadas son claramente más bajas que en el resto.

TABLA 1

Caracterización de medias de valores isotópicos de los diversos FAMEs por tipo muestra de animal y alimento

Tipo	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Media	-31,4149		-30,1901	-32,1897
Pienso N				
N (nº análisis)	2		2	2
Desv. típica	,81303		1,13117	,04242
Media	-27,8055	-27,8005	-26,6207	-29,5102
Pienso L				
N (nº análisis)	2	2	2	1
Desv. típica	1,61899	3,73287	,49489	.
Media	-31,2297	-30,0068	-30,5100	-31,2276
Bellotas Encina				
N (nº análisis)	10	4	10	10
Desv. típica	,79747	1,58812	1,42665	1,00078
Bellotas				
Media	-29,3554		-28,5706	-30,6200

Alcornoque	N (nº análisis)	2		2	2
	Desv. típica	,60062		,72141	,24035
Blanco Pienso	Media	-26,1913	-25,0783	-25,6051	-30,0391
	N (nº análisis)	28	28	28	28
	Desv. típica	,67579	1,11035	,79386	1,06136
	Media	-24,4973	-22,6833	-24,6994	-29,6755
Ibérico Pienso	N (nº análisis)	18	18	18	18
	Desv. típica	,55363	1,42049	,95362	1,74256
31 lb Recebo	Media	-25,7570	-24,2049	-26,2297	-29,2412
	N (nº análisis)	25	25	25	25
	Desv. típica	,55967	,85068	,56818	,84441
	Media	-26,4295	-25,9765	-27,2140	-30,3024
32 lb Recebo	N (nº análisis)	18	18	18	18
	Desv. típica	,53791	,63538	,25228	1,33636
33 lb Recebo	Media	-20,9302	-20,4263	-22,7552	-23,9850
	N (nº análisis)	14	14	14	14
	Desv. típica	1,51245	1,57065	1,42060	1,61468
	Media	-27,5278	-26,8023	-28,0154	-31,7983
65 lb Bellota	N (nº análisis)	10	10	9	10
	Desv. típica	,21129	,56627	,33526	,81747
66 lb Bellota	Media	-26,4548	-25,7501	-27,6126	-30,5867
	N (nº análisis)	23	23	23	23
	Desv. típica	,29757	,38442	,33418	,67148
	Media	-26,6482	-25,8527	-27,4986	-30,6695
67 lb Bellota	N (nº análisis)	23	23	23	23
	Desv. típica	,37828	,68809	,27512	,61605
Total	Media	-26,1319	-24,8465	-26,5589	-29,7805
	N (nº análisis)	175	165	174	174
	Desv. típica	2,24477	2,15097	1,93707	2,13571

Confirmadas pues las diferencias, se procedió al análisis discriminante de componentes principales, al objeto de explorar la asignación de muestras individuales a una u otra categoría en base a los datos isotópicos determinados. Los resultados del análisis discriminante están representados en la Fig. 10, y en la Tabla 2 se recoge el resumen de resultados.

El análisis discriminante indicaba que el 73% de los casos fueron asignados correctamente. Si en lugar de utilizar los grupos tal y como se definieron, se explora la pertenencia a las tres grandes categorías “pienso”, “recebo” y “bellota”, el porcentaje de muestras incorrectamente clasificadas disminuye drásticamente.

Tabla 2.- Resultados de la clasificación^(a) en base a las funciones discriminantes canónicas principales correspondientes a las muestras consideradas.

Tipo	GRUPO PREDICHO DE PERTENENCIA										Total
	Pienso L	Bellotas Encina	Blanco Pienso	Ibérico Pienso	31 lb Recebo	32 lb Recebo	33 lb Recebo	65 lb Bellota	66 lb Bellota	67 lb Bellota	
Pienso L	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Bellotas Encina	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Blanco Pienso	0	0	25	0	2	0	0	0	0	1	28
Ibérico Pienso	0	0	3	13	2	0	0	0	0	0	18
31 lb Recebo	0	0	0	1	21	0	0	0	0	3	25
32 lb Recebo	0	0	0	0	1	6	0	2	4	5	18
33 lb Recebo	0	0	0	1	0	0	13	0	0	0	14
65 lb Bellota	0	0	0	0	0	0	0	6	0	3	9
66 lb Bellota	0	0	0	0	0	0	0	0	20	3	23

Tabla 2 (cont.)

		Porcentaje														
		67 lb Bellota	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	11	23
	Pienso L	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	Bellotas Encina	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	Blanco Pienso	0	0	89,3	0	0	7,1	0	0	0	0	0	0	0	3,6	100
	Ibérico Pienso	0	0	16,7	72,2	11,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	31 lb Recebo	0	0	0	4	84	0	0	0	0	0	0	0	0	12	100
	32 lb Recebo	0	0	0	0	5,6	33,3	0	0	0	0	11,1	22,2	27,8	100	100
	33 lb Recebo	0	0	0	7,1	0	0	0	92,9	0	0	0	0	0	0	100
	65 lb Bellota	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66,7	0	33,3	100	100	100
	66 lb Bellota	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	87	13	100	100	100
	67 lb Bellota	0	0	0	0	4,3	4,3	0	0	0	4,3	39,1	47,8	100	100	100

(a) 73,0% de los casos originales agrupados son correctamente clasificados.

La asignación de muestras desconocidas a uno u otro grupo se hizo mediante representación de los datos isotópicos correspondientes a $\delta^{13}\text{C}$ (C18:1) frente a otros parámetros en gráficos binarios, y en los casos no conclusivos, mediante la opción de informe individual del análisis discriminante, que da la probabilidad máxima de pertenencia a un grupo dado, y, alternativamente, el segundo grupo más probable al que deba ser asignada la muestra desconocida.

Las diversas técnicas que emplean determinaciones de isótopos estables permiten caracterizar los cerdos; los productos de ellos derivados, y el régimen alimenticio a que fueron sometidos.

De los datos presentados se deducen fuertes heterogeneidades, tanto entre categorías (distintos lotes atribuidos a una misma clase: “pienso”, “recebo”, “bellota”) como incluso dentro de un mismo lote. Las razones de esta heterogeneidad difícilmente responden a causas “naturales”, pero la demostración fehaciente de las mismas requiere disponer de muestras de referencia “genuinas”, pudiendo ser útil el establecer una “base de datos de muestras auténticas”, análoga a la que ya existe para el mercado del vino (Reglamento (CEE) No 2676/90). Los datos presentados demuestran pues que distintos tipos de alimentación dan lugar a distintas relaciones isotópicas, y que éstas permiten deducir el régimen alimenticio del animal del que deriva el producto final.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de identificación de productos alimenticios de origen animal, según la dieta de dicho animal, que comprende:
- a. la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) de muestras de grasa;
 - b. la separación de los FAMES del paso (a);
 - 10 c. combustión o pirolisis de los FAMES del paso (b); y
 - d. análisis mediante espectrometría de masas de la relación isotópica natural de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los productos obtenidos en el paso (c).
- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde la separación del paso (b) es mediante cromatografía de gases.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la espectrometría se realiza mediante un espectrómetro de masas de fuente gaseosa y de flujo continuo.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las muestras son de tejido adiposo del animal o de componente graso del producto alimenticio.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los FAMES que se analizan son al menos cuatro seleccionados de entre C12:0 a C20:1.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el animal es *sus scrofa domestica* (cerdo).
7. Método según la reivindicación anterior, donde el producto alimenticio es jamón curado, paleta, caña de lomo o embutidos.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde se identifica si el jamón curado, la paleta, la caña de lomo o los embutidos son de cebo, recebo o bellota.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde los FAMES a analizar son al menos el ácido oleico, palmítico, linoleico y esteárico.
- 35 10. Método según la reivindicación 9, donde además se analizan en ácido mirístico y/o gadoleico.

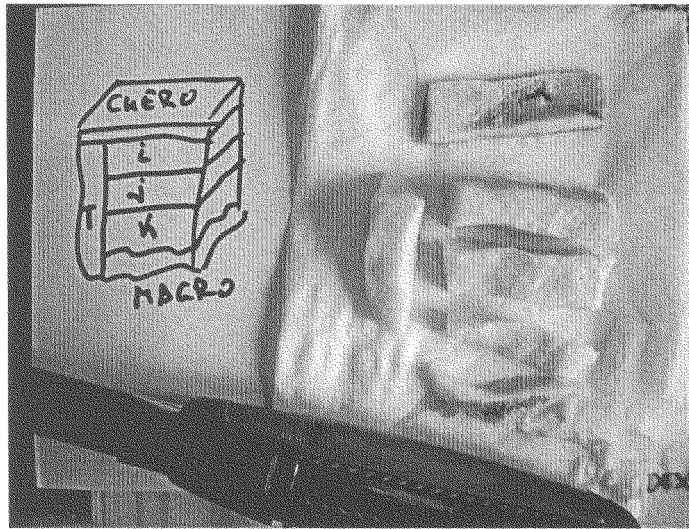


FIG. 1

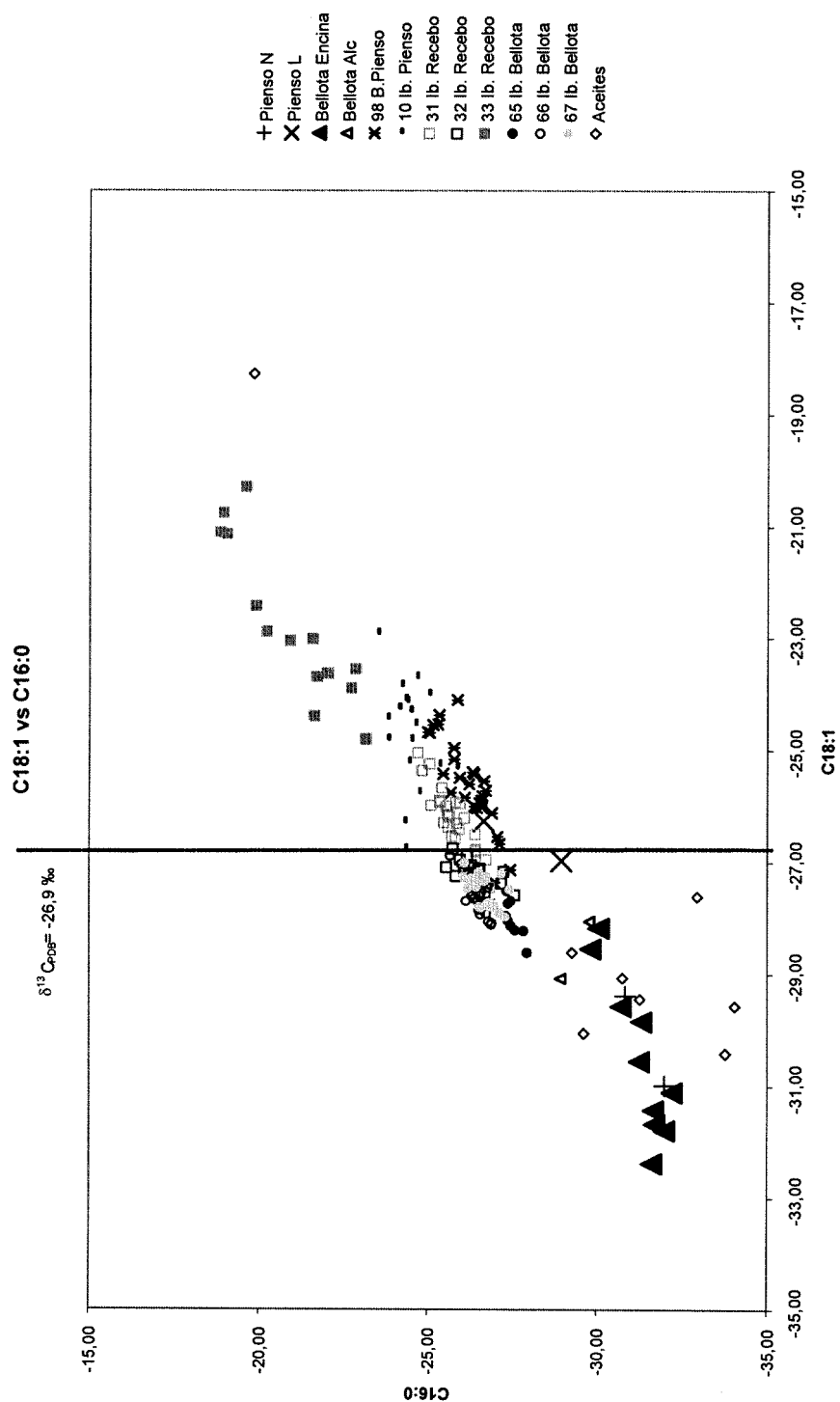


FIG. 2

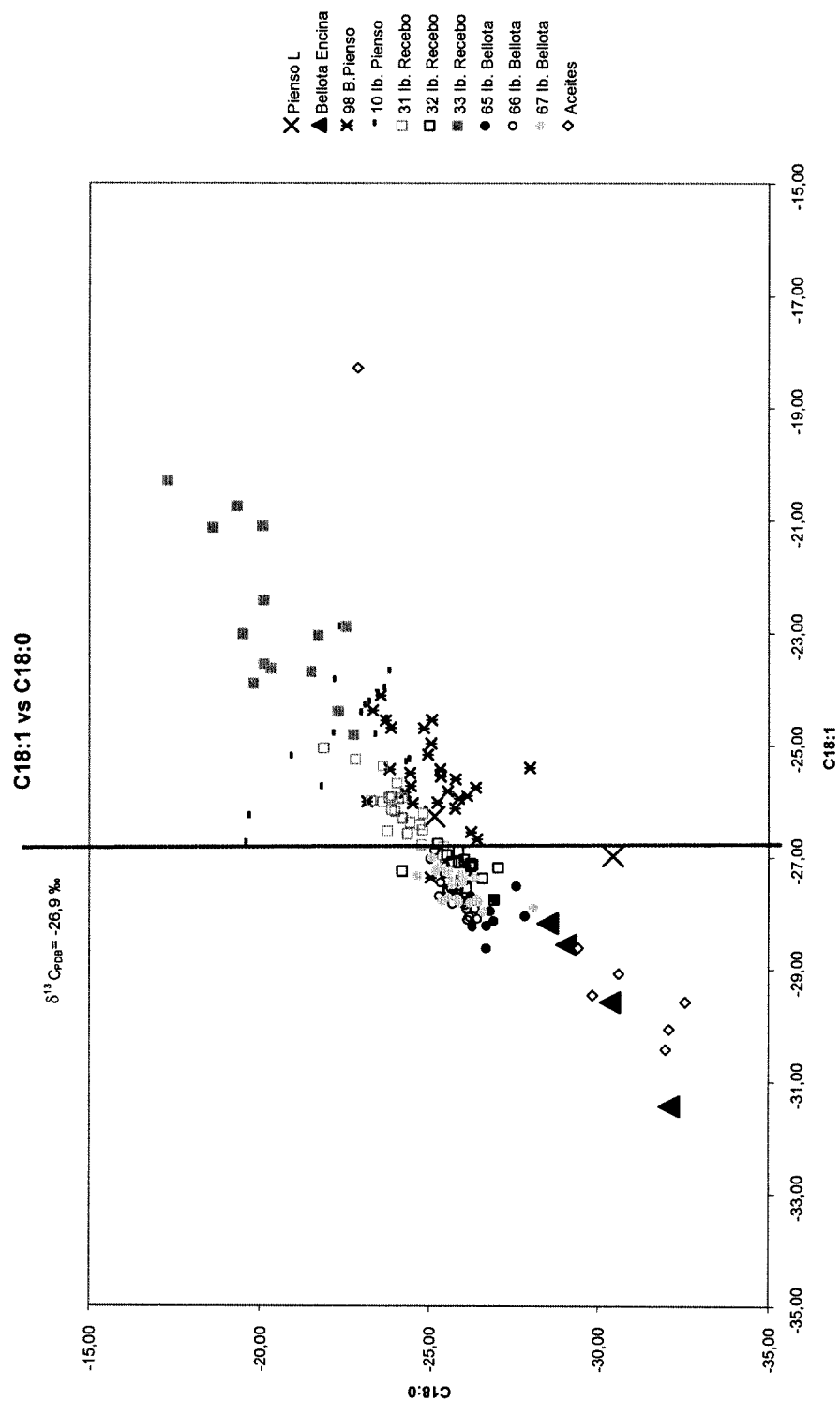


FIG. 3

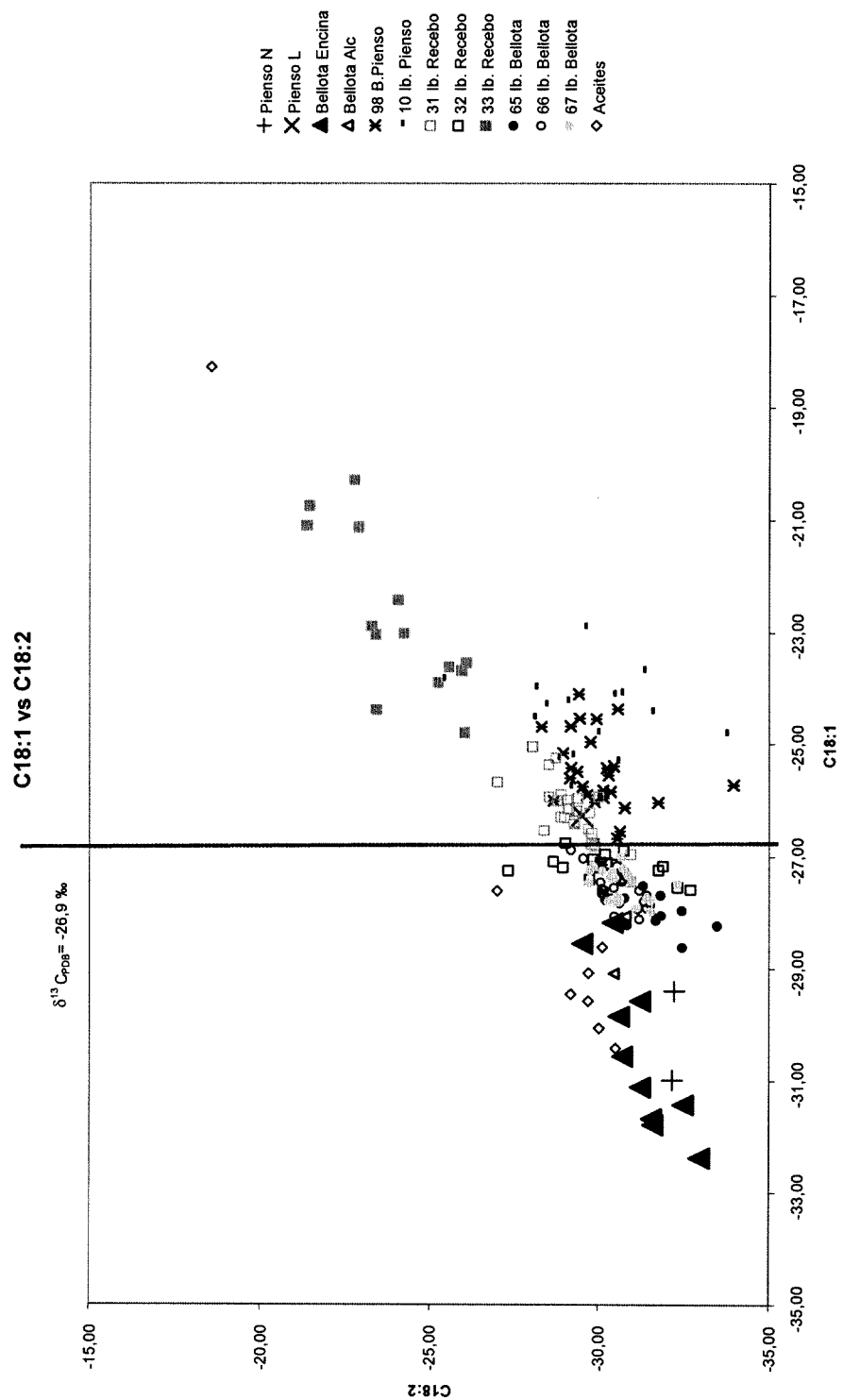


FIG. 4

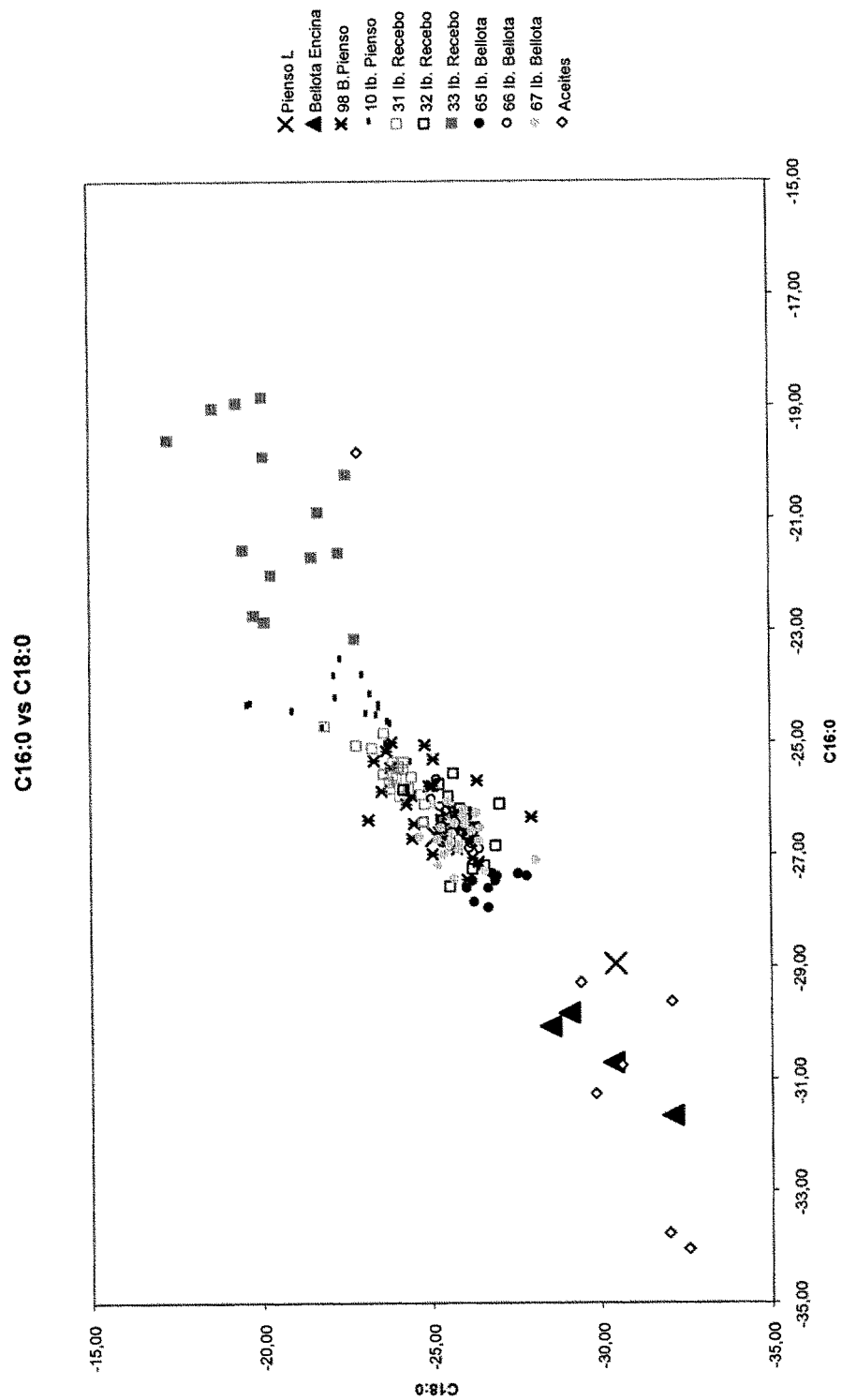


FIG. 5

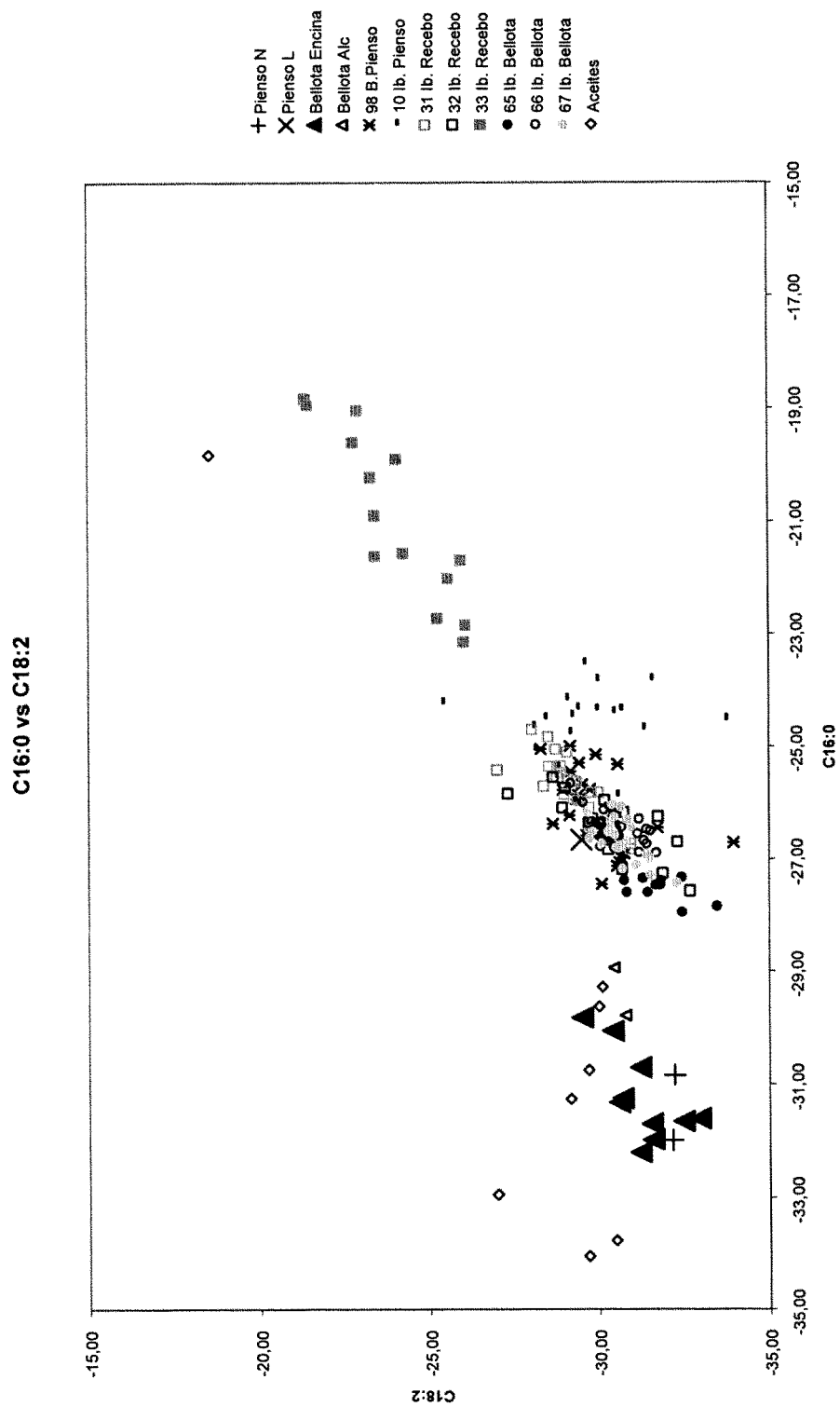


FIG. 6

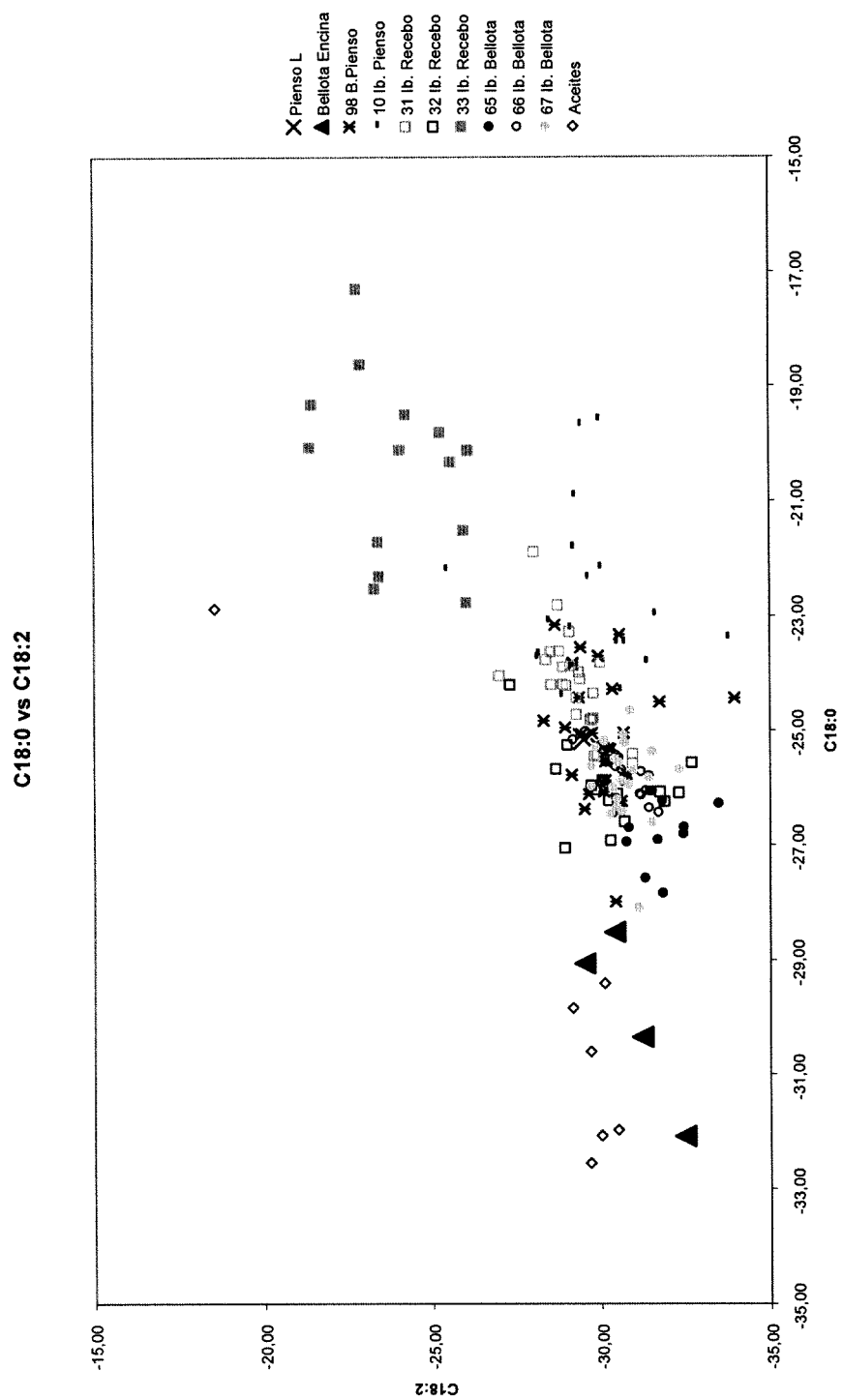


FIG. 7

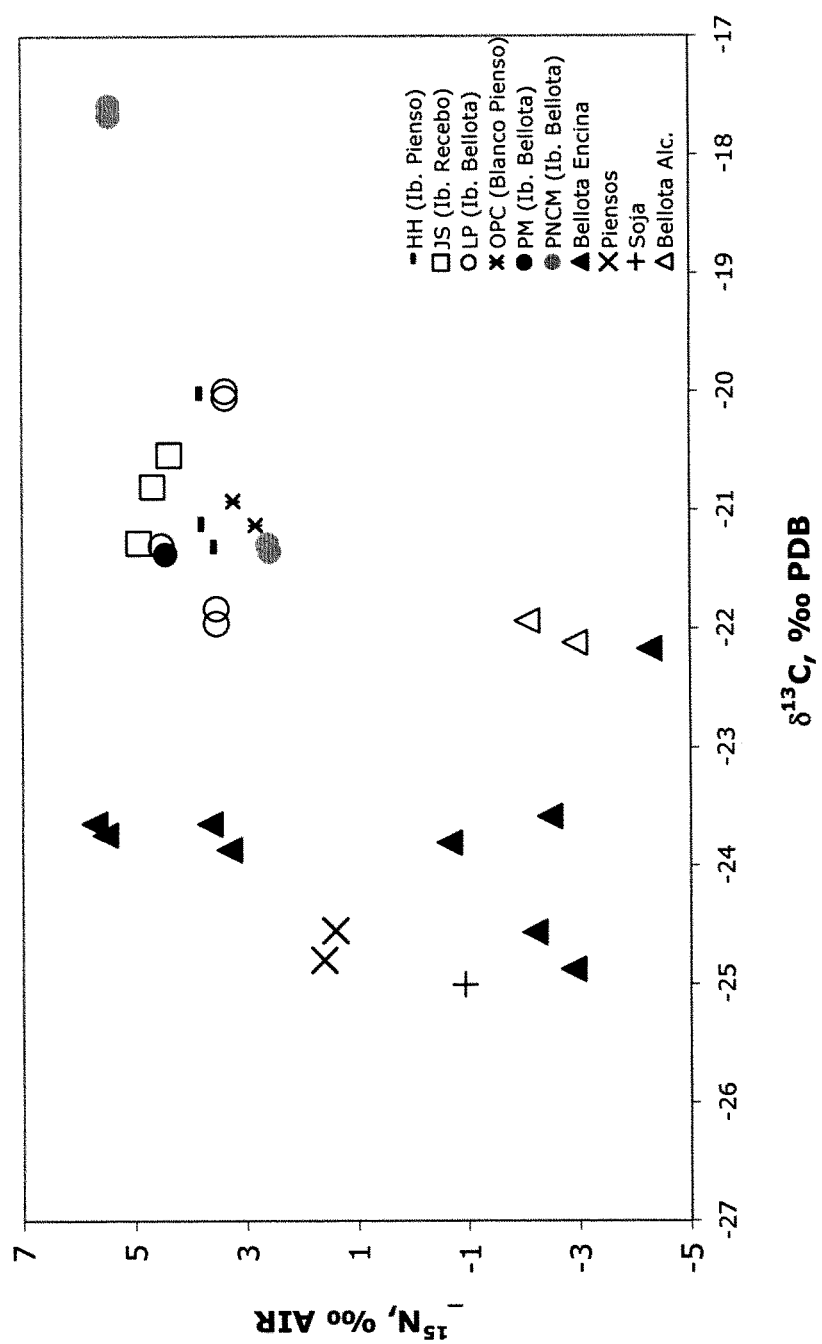


FIG. 8

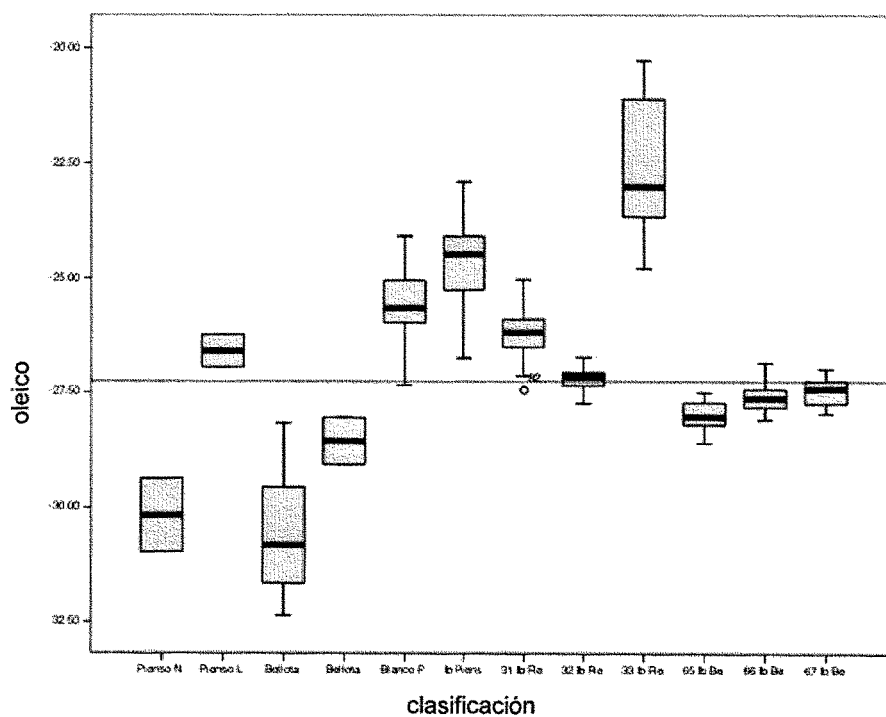
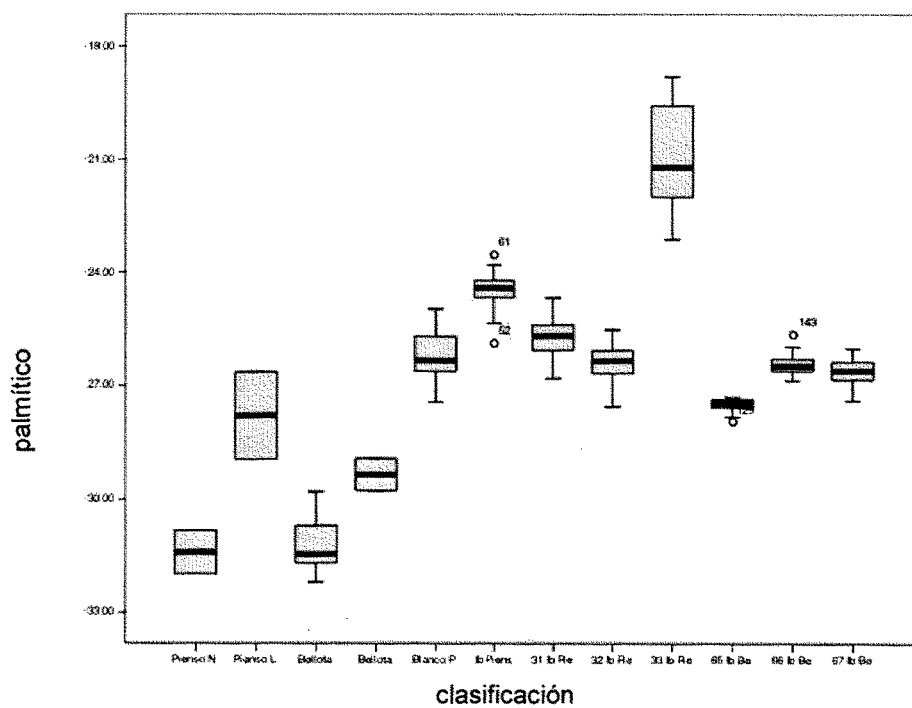
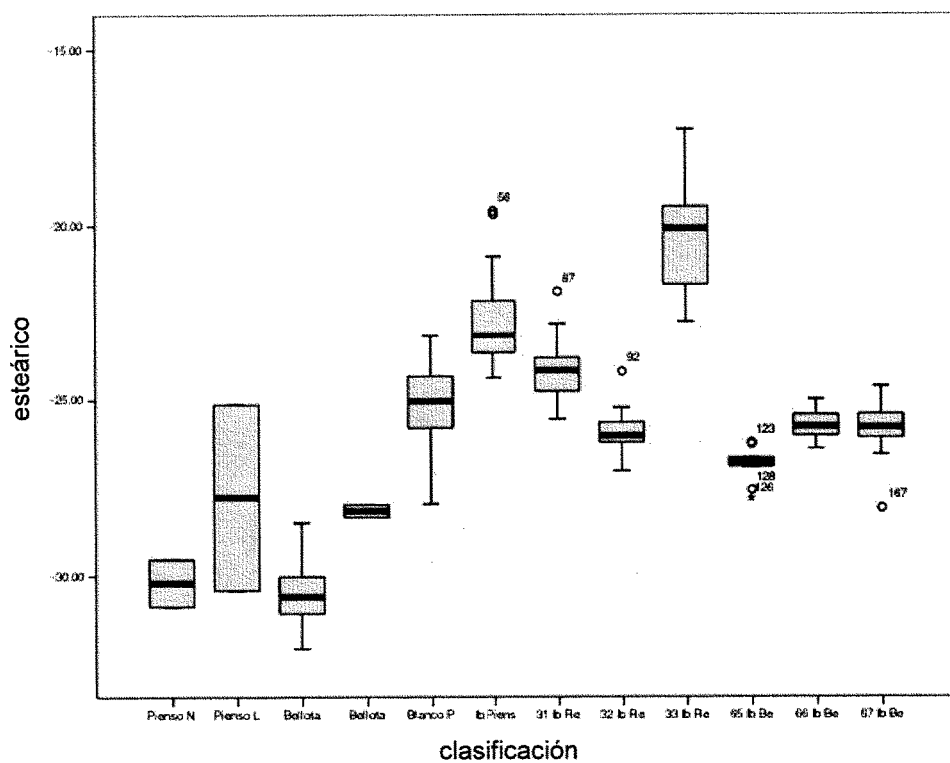
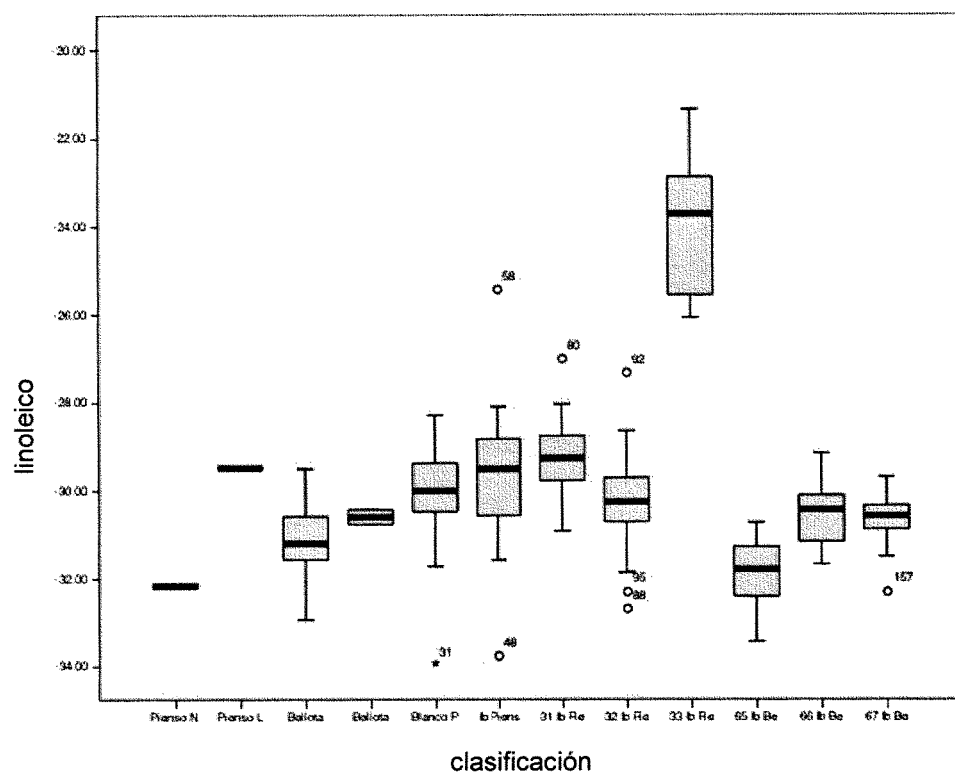


FIG. 9



C



D

FIG. 9 (cont.)

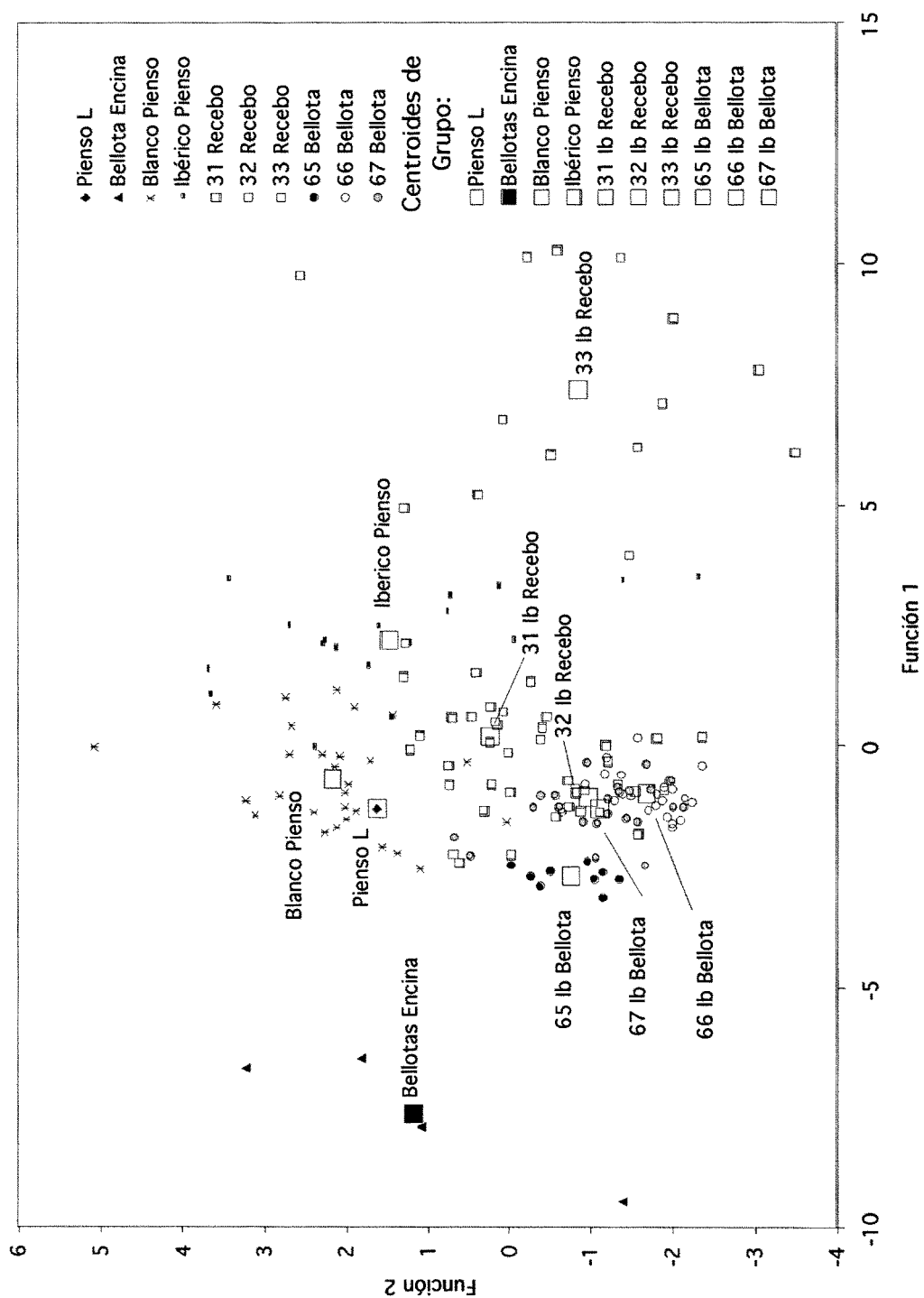


FIG. 10



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 326 249

⑫ Nº de solicitud: 200702710

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 16.10.2007

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2100130 A1 (UNIVERSIDAD DE SALAMANCA) 01.06.1997, todo el documento.	1-10
A	PIASSENTIER, E. et al.: "Stable Isotope Ratio Analysis for Authentication of Lamb Meat", Meat Sci. (2003), vol. 64, pp.: 239-247, todo el documento.	1-10
A	GONZÁLEZ-MARTÍN, I. et al.: "Nuevas técnicas analíticas para la caracterización de los productos del cerdo ibérico: isótopos estables y nariz electrónica" en "II JORNADAS -EL CERDO IBÉRICO Y SUS PRODUCTOS-", Salamanca, 24 y 25 de mayo de 2000, -Libro de Ponencias-.	1-10
A	GONZÁLEZ-MARTÍN, I. et al.: "Differentiation of Dietary Regimene of Iberian Swine by Means of Isotopic Analysis of Carbon and Sulphur in Hepatic Tissue", Meat Sci. (2001), vol. 58, pp.: 25-30, todo el documento.	1-10
A	WINKLER, F.J. et al.: "Einsatzmöglichkeiten der ¹³ C-Isotopen-Massenspektrometrie in der Lebensmitteluntersuchung", Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1980), vol. 171, pp.: 85-94; todo el documento, en particular, pág. 86 y pág. 92.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

17.09.2009

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 30/72 (2006.01)

B01D 59/44 (2006.01)

G01N 33/12 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, B01D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, FSTA, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-10	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-10	SÍ
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2100130 A1	01-06-1997
D02	PIASENTIER, E. et al., Meat Sci., vol. 64, pp.: 239-247	2003
D03	GONZÁLEZ-MARTÍN, I. et al., Meat Sci., vol. 58, pp.: 25-30	2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica un método para la identificación de productos alimenticios de origen animal, en función de la dieta ingerida por dicho animal. Está basado en la relación isotópica natural $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los ésteres metílicos de ácidos grasos procedentes de muestras de grasa obtenidas de los mencionados productos alimenticios.

El estado de la técnica anterior reflejado en D01-D03, ya contempla la opción de identificar el origen de los alimentos de procedencia animal mediante la relación de los isótopos naturales contenidos en su composición. Sin embargo, la solicitud va un paso más allá al reivindicar un procedimiento en el que previamente al análisis de dichos isótopos en la muestra obtenida del alimento, se lleva a cabo una separación de los ácidos grasos (en forma de ésteres metílicos) contenidos en aquélla mediante cromatografía de gases. De esta manera se consigue afinar más el procedimiento de identificación respecto a lo descrito en D01-D03. La solicitud y el estado de la técnica anterior (D01-D03) resuelven así el mismo problema de diferente manera. Por ello, se considera que la solicitud cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva.