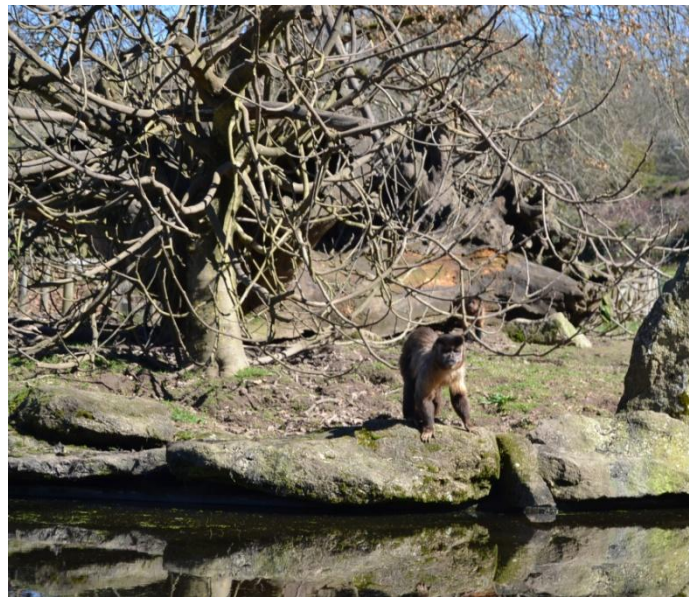


Facultad de Ciencias
Departamento de Ciencias de la Navegación y de la Tierra
Área de Paleontología

Utilización del estudio de isótopos estables de C y N en heces de mamíferos en condiciones controladas para la determinación de la dieta en animales silvestres

Utilización do estudo de isótopos estables de C e N en feces de mamíferos en condicións controladas para a determinación da dieta en animais silvestres

Using the study of stable isotopes of C and N in feces of mammals under controlled conditions for determining diet in wild animals



Elena Armada Tojeiro

Trabajo de fin de grao

29 de Julio de 2015

Dirigido por: Dra. Aurora Grandal d'Anglade – Dña. Esther Valderrábano Cano

ÍNDICE:

	PÁGINA
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Utilización de isótopos estables en estudios sobre alimentación.....	2
2.2. Los isótopos estables.....	2
2.3. El factor de fraccionamiento.....	3
2.4. Información obtenida en heces y pelo.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
4.1. Material.....	6
4.1.1. Listado de animales seleccionados para el estudio.....	6
4.1.2. Listado de alimentos que consumen los animales utilizados en el estudio.....	10
4.2. Métodos.....	10
5. RESULTADOS.....	14
5.1. Resultados análisis IRMS de los alimentos.....	14
5.2. Resultados análisis IRMS de las heces.....	17
5.3. Resultados análisis IRMS de los pelos.....	18
6. DISCUSIÓN.....	21
7. CONCLUSIONES.....	23
8. BIBLIOGRAFÍA.....	25
9. ANEXOS.....	27

1. RESUMEN

La utilización de isótopos estables en diversos estudios sobre ecología y alimentación de especies es cada vez más frecuente, debido a la fácil obtención de las muestras y la gran cantidad de información que aportan. En este proyecto se realizó un estudio de alimentación controlada en Marcelle Natureza de varias especies animales: primates, ungulados, un herbívoro, un omnívoro y un carnívoro estricto. A partir de los datos obtenidos se pretende comprobar la relación entre los valores isotópicos de la dieta con los de las heces y pelo, además de observar si existe un factor de fraccionamiento entre ellas y, en caso de existir, si es común a todos los grupos. Para ello se recogieron muestras de alimentos crudos, heces y pelos, que fueron tratadas en el laboratorio para su correcta homogenización y analizadas mediante un IRMS (espectrometría de masas para la medida de relaciones isotópicas). Los resultados muestran que cada una de las dietas tiene sus propios valores isotópicos, aunque son similares según su grupo trófico. En el análisis de los pelos, todos los valores se enriquecen, sobre todo los isótopos de nitrógeno. Sin embargo, en el análisis de las heces, los resultados son más variables, lo que puede estar influido por los diferentes componentes que la forman. Si se quieren obtener datos más precisos, ya que en este caso solo se trata de un muestreo puntual, sería necesaria una recogida de muestras durante un periodo de tiempo mayor.

ABSTRACT

The use of stable isotopes in ecology and feeding studies is more and more frequent, due to the easier sample collection and the lot of information provided. In this Project we perform a controlled feeding study on several animal species in Marcelle Natureza: primates, ungulates, an herbivore, an omnivore and a strict carnivore. From the data obtained we will test the relationship between the isotopic values of the diet with those from feces and hair, in order to know if there is a fractionation factor between the samples and, if existing, if it is common to all groups. For this, samples of raw food, feces and hair were collected and treated in the laboratory for proper homogenization, and were analyzed by IRMS (isotope-ratio mass spectrometry). The results show that each type of diet has its own isotopic values, although it is similar for each trophic group. In the analysis of hairs, all values, but specially nitrogen isotopes, are enriched. However, in the analysis of feces the results are more variable, which can be influenced by the different components that comprise this kind of samples. To get more precise data, since in this case just spot sampling was performed, it would be necessary to collect and analyze samples for a longer period of time.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Utilización de isótopos estables en estudos sobre alimentación.

La clave para la protección y la gestión de especies reside en entender su relación con el medio ambiente y la situación de sus poblaciones, es decir, conocer su estrategia vital y ecología. Una parte de la información que se necesita de cada especie incluye sus requerimientos alimenticios y fisiología, para poder crear un modelo de gestión que tenga en cuenta todas sus necesidades.

En este proyecto se van a presentar los resultados de un estudio de alimentación controlada mediante el análisis de isótopos estables en diferentes grupos animales que se encuentran en el parque zoológico Marcelle Natureza. Se centra sobre todo en cuatro especies de primates: lemur de cara blanca (*Eulemura albifrons*), mono capuchino (*Cebus apella*), macaca cangrejera (*Macaca fascicularis*) y babuino africano (*Papio papio*). Con ello, se podrá determinar si las muestras de pelo y heces son un reflejo fiable de su alimentación y si se pueden utilizar como herramienta para la reconstrucción de la dieta. Todas son especies omnívoras, aunque existe alguna diferencia, puesto que unos consumen mayor cantidad de proteína animal o de vegetales. Además, se va a establecer una comparación con otros animales: un carnívoro estricto como la jineta (*Genetta genetta*); tres herbívoros, burro africano (*Equus africanus*), cabra enana (*Capra aegagrus hircus*) y wallaby de Bennet (*Macropus rufogriseus*) y otro omnívoro, el oso pardo (*Ursus arctos*), para observar las diferencias existentes dependiendo de su alimentación.

La utilización de los valores de los isótopos estables de carbono (^{13}C) y nitrógeno (^{15}N) como herramienta en los estudios ecológicos es cada vez más frecuente, sobre todo para la investigación de la dieta de mamíferos (Hobson y Quirk, 2014), la realización de estudios sobre el nicho ecológico y la utilización del hábitat (Oelze *et al.*, 2014), el seguimiento de la migración animal o interacciones huésped parásito (Boecklen *et al.*, 2011), entre otras. También pueden ser útiles para una mayor comprensión del comportamiento de los contaminantes que se ingieren con la dieta y cómo afecta a las cadenas tróficas (Crawford *et al.*, 2008).

2.2 Los isótopos estables.

Los isótopos son átomos con el mismo número de protones y electrones, pero con diferente número de neutrones. Se denominan isótopos estables porque energéticamente son estables y no se deterioran, es decir, no son radiactivos (Lajtha y Michener, 2007). Existen átomos de carbono con masas atómicas de 12 y 13, representados por ^{12}C y ^{13}C respectivamente, que son los isótopos estables correspondientes al carbono (Panarello *et al.*, 2006-2009). El nitrógeno también tiene dos isótopos, uno en forma de ^{14}N , y un isótopo pesado menos común, ^{15}N (Crawford *et al.*, 2008). Como los isótopos estables tienen diferente masa, su comportamiento varía dependiendo del ambiente y de los procesos fisiológicos a los que se vean sometidos, dando lugar a variaciones de su abundancia relativa (fraccionamiento isotópico) y que se miden con un espectrómetro de masas (Crawford *et al.*, 2008).

La relación entre los isótopos estables se expresa mediante la notación delta (δ), y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\delta = \left(\frac{R_{muestra}}{R_{estándar}} - 1 \right) \times 1000$$

Rmuestra y Restándar son las fracciones pesadas y ligeras de la muestra y del estándar. A continuación se resta una unidad para poder obtener valores negativos si la muestra contiene una proporción de isótopo pesado menor (muestra empobrecida), o positivo si su proporción es mayor (muestra enriquecida). El dato obtenido se multiplica por mil, consiguiendo la notación δ en partes por mil (‰), ya que las desviaciones son muy pequeñas, facilitando el trabajo con los datos (Panarello *et al.*, 2006-2009). La proporción de $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ se expresa como $\delta^{13}\text{C}$ y la proporción $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ se convierte en $\delta^{15}\text{N}$ (Crawford *et al.*, 2008). El estándar para el carbono es una formación de piedra caliza (Peedee Belemnite) de fósiles marinos de Carolina del Sur (Craig, 1957 en Kelly, 2000), y para el nitrógeno se utiliza la proporción de nitrógeno atmosférico (Ehleringer y Rundel, 1989 en Kelly, 2000). La mayoría de los tejidos vegetales y animales tienen un valor negativo de $\delta^{13}\text{C}$ y negativo de $\delta^{15}\text{N}$, es decir la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ es menor que la de la piedra caliza y la relación $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ es mayor que el nitrógeno atmosférico (Kelly, 2000).

2.3 El factor de fraccionamiento.

La razón principal de la utilización del análisis de isótopos estables es la existencia de una relación entre los valores isotópicos de la dieta que ingiere el animal con los valores medidos en las heces y el pelo, basándose en que "Eres lo que comes" (Boecklen *et al.*, 2011), debido a que los tejidos reflejan la composición del alimento y que estos se sintetizan a partir de los nutrientes (Salvarina *et al.*, 2013). Es decir, los valores obtenidos en los tejidos hacen referencia a la porción de la dieta que el organismo asimiló (Hobson y Clark, 1992 en Panarello *et al.*, 2006-2009). Sin embargo, se ha demostrado que existen diferencias significativas entre esos valores (Boecklen *et al.*, 2011). Esas diferencias en las relaciones isotópicas entre la comida ingerida y los productos analizados (heces, pelo) se definen como factor de fraccionamiento isotópico (Panarello *et al.*, 2006-2009). Una de las causas principales del fraccionamiento es la fijación del CO_2 durante la fotosíntesis (Tycot, 2004) ya que los valores de carbono son diferentes dependiendo del tipo de metabolismo de las plantas (Crawford *et al.*, 2008). Las plantas C3 (árboles, arbustos e hierbas de clima templado) y C4 (herbáceas tropicales como *Zea mays*) fraccionan de forma diferente los isótopos de carbono dando lugar a valores de $\delta^{13}\text{C}$ que no se solapan (Codron *et al.*, 2005a). El valor de $\delta^{13}\text{C}$ de las plantas C3 se encuentra dentro de un rango de valores de -35 a -21‰, mientras que el rango de las C4 es de -14 a -10‰ (Boutton, 1991; Ehleringer, 1991 en Kelly, 2000), por lo que los valores de las plantas C4 muestran un enriquecimiento del 12-14‰ en comparación con las C3 (Crawford *et al.*, 2008). El fraccionamiento que se observa en los valores de los isótopos de carbono también está relacionado con el tipo de tejido que se analiza, y las diferentes rutas metabólicas por las que pasa el carbono una vez en el interior del organismo. Esto se demostró mediante un estudio con dietas controladas, en el que el pelo mostraba un enriquecimiento positivo en ^{13}C en comparación con otros tejidos (Hobson y Quirk, 2014).

En el caso del nitrógeno, el factor de fraccionamiento está relacionado con la capacidad de las plantas para obtener el nitrógeno directamente del suelo en forma de

nitrito, o si lo obtienen gracias a la existencia de una relación simbiótica con microorganismos (Tycot, 2004). Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los materiales naturales se encuentran entre -20 a +45‰ (Kelly, 2000). Estos valores indican la posición en la cadena trófica del organismo, observándose en sus tejidos un incremento de los niveles de ^{15}N de un 2-4‰ (Kelly, 2000), al aumentar el nivel trófico (Codron *et al.*, 2005a). También se sabe que los valores de ^{15}N de un animal aumentan con la mayor ingesta de proteínas en su dieta y disminuye al aumentar la calidad de la proteína referida a su composición aminoacídica (Kurle *et al.*, 2014). También existen factores ambientales que pueden afectar al fraccionamiento de los isótopos de nitrógeno, como las precipitaciones y la altitud (Ambrose, 1991 en Tykot, 2004).

En algunos estudios realizados con mamíferos, se observó que el fraccionamiento de los isótopos de nitrógeno podía estar relacionado con la exposición del animal a estrés hídrico (Kelly, 2000). En este caso no se debe tener en cuenta pues todos los animales cada día tienen a su disposición la cantidad de agua y alimentos necesarios, o aquella que ellos mismos consideren suficiente. El fraccionamiento también se ve influido por las diferentes rutas bioquímicas que se producen en todo el tracto gastrointestinal, como la actuación de enzimas estomacales o los procesos de aminación y desaminación (Hwang *et al.*, 2007).

2.4 Información obtenida en heces y pelo.

El pelo y las heces proporcionan diferente información. Los valores de ^{13}C de las heces refleja la dieta consumida durante un período corto de tiempo, es decir, pocos días antes de la deposición (Codron *et al.*, 2005b); mientras que el pelo contiene información de períodos más largos como meses o años (Codron y Codron, 2009). Hay que tener en cuenta que los valores de ^{13}C del pelo muestran la composición de isótopo de carbono de las proteínas, no de toda la dieta ingerida y que presenta un enriquecimiento positivo en comparación con otros tejidos (Hobson y Quirk, 2014). Se considera que las heces ofrecen una mayor cantidad de información dietética, aunque en este caso, las heces muestran una representación puntual del alimento y si se quisiera realizar un estudio más concreto, con el objetivo de conseguir la determinación precisa de la dieta, sería necesaria la recogida de muestras durante un período más largo en el tiempo (Sponheimer *et al.*, 2003b). El fraccionamiento presente en las heces es más complicado de determinar cuando los animales tienen dietas mixtas, además de la presencia de componentes mal digeridos (Jones *et al.*, 1979 en Sponheimer 2003b). También hay que tener en cuenta que las muestras se recogieron en la temporada de invierno, y que durante los cambios estacionales los veterinarios de Marcelle Natureza modifican la alimentación de los animales según sus necesidades fisiológicas.

Es importante destacar que se trata de una técnica en la que la recogida de muestras es sencilla, sobre todo las heces, y que en la que no se necesita interferir con el animal (Codron y Codron, 2009), además de que se obtiene una gran cantidad de información sin que se sacrifique al animal y sin tener que realizar una observación directa y continua (Codron *et al.*, 2005b). Este método puede utilizarse como complemento de otro tipo de estudios como el análisis de restos macroscópicos de heces, secuenciamiento de ADN, etc.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es comprobar la existencia de la relación isotópica entre heces y pelo con los de los alimentos que consumen los animales, además de si se produce, o no, un fraccionamiento que quede registrado en las muestras, cómo influye en los resultados, cómo varía según la dieta y si hay similitudes entre especies. Todo esto facilitaría la obtención de los datos alimenticios de las especies que están siendo estudiadas o para futuros descubrimientos, debido a que obtener la información sobre los recursos disponibles y los que realmente consumen es complicado (Codron *et al.*, 2005a), como las restricciones que se pueden dar en la observación directa (Fahy *et al.*, 2013). Además, sería una gran herramienta para la reintroducción de especies en peligro de extinción, permitiendo una mejor selección del hábitat y con ello, el aumento de las probabilidades de supervivencia.

En el caso de los babuinos, se podría utilizar para estimar el impacto que causa la expansión del ser humano en su alimentación, detectando las variaciones en los patrones alimenticios. Así se puede evitar sus incursiones en terrenos cultivados y los ataques que reciben por parte de los agricultores, como sucede en el sur de África con los cercopitecos verdes (*Chlorocebus pygerythrus*) (Loudon *et al.* 2014).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

El parque zoológico de Marcelle Natureza (San Martín de Guillar, Outeiro de Rei– Lugo), se creó con la finalidad de conservar la biodiversidad y la protección de la fauna silvestre. Para ello cuentan con un elevado número de especies, todas procedentes de otros zoos o de centros de recuperación y rescate, que no pueden ser devueltos a su hábitat natural. Todos están ubicados en parcelas preparadas especialmente para cada especie, proporcionándoles las condiciones necesarias para su buen estado físico y psicológico. Alguno de los animales llegó al parque con esterotipias muy marcadas, por lo que se les prepararon unas actividades rutinarias para lograr corregir ese comportamiento. Además, Marcelle Natureza participa en varios programas de cría en cautividad de especies amenazadas, que serán enviadas a repoblar poblaciones salvajes, y en investigaciones sobre la conservación de especies.

4.1.1. Listado de animales seleccionados para el estudio

Babuino africano (*Papio papio*)



Clase Mammalia
Subclase Theria
Infraclase Eutheria
Orden Primates
Suborden Haplorrhini
Infraorden Simiiformes
Parvorden Catarrhini
Superfamilia Cercopithecoidea
Familia Cercopithecidae
Subfamilia Cercopithecinae
<i>Papio papio</i> DESMAREST 1820

- Distribución: Senegal, Mauritania, Mali.
- Hábitat: bosques húmedos, sabanas, zonas áridas o montañosas que pueden llegar a 4.500 metros de altura.
- Dieta: principalmente se alimenta de materia vegetal (hojas, brotes, ramas, frutos y tubérculos). Complementan su dieta con proteína animal proveniente de anélidos, insectos, huevos e incluso pequeños mamíferos.

Lemur de cara blanca (*Eulemur albifrons*)



Clase Mammalia
Subclase Theria
Infraclase Eutheria
Orden Primates
Suborden Strepsirrhini
Infraorden Lemuriformes
Familia Lemnidae
<i>Eulemur albifrons</i> GEOFFROY 1796

Tomada de la página oficial de Marcelle Natureza.

- Distribución: áreas costeras de Madagascar.
- Hábitat: zonas boscosas.
- Dieta: compuesta principalmente por fruta, hojas, flores y, en determinadas ocasiones, puede ingerir pequeños animales.

Macaca cangrejera (*Macaca fascicularis*)



Clase Mammalia
 Subclase Theria
 Infraclase Eutheria
 Orden Primates
 Suborden Haplorrhini
 Infraorden Simiiformes
 Parvorden Catarrhini
 Superfamilia Cercopithecoidea
 Familia Cercopithecidae
 Subfamilia Cercopithecinae
Macaca fascicularis RAFFLES 1821

Tomada de la página oficial de Marcelle Natureza.

- Distribución: Sur de Indochina, Burma y Borneo, Islas Filipinas.
- Hábitat: bosques costeros, pantanos y lagos.
- Dieta: fruta y hojas son los componentes principales. En menor medida ingiere pequeños animales como insectos o algún tipo de cultivo.

Mono capuchino (*Cebus apella*)



Clase Mammalia
 Subclase Theria
 Infraclase Eutheria
 Orden Primates
 Suborden Haplorrhini
 Infraorden Simiiformes
 Parvorden Platyrrhini
 Familia Cebidae
Sapajus (Cebus) apella LINNAEUS 1758

Tomada de la página oficial de Marcelle Natureza.

- Distribución: todo el sur de América
- Hábitat: bosques tropicales y subtropicales, incluyendo alguna zona de manglar.
- Dieta: hojas de árboles y frutas. Puede ingerir también pequeños crustáceos y moluscos.

Burro africano (*Equus africanus*)



Clase Mammalia
Subclase Theria
Infraclasse Eutheria
Orden Perissodactyla (Owen, 1848)
Suborden Hippomorpha Wood, 1937
Superfamilia Equoidea
Familia Equidae
Subfamilia Equinae
Equus africanus HEUGLIN & FITZINGER
1866

- Distribución: Sudán, Etiopía y Somalia.
- Hábitat: montañas, llanuras herbáceas y desiertos rocosos.
- Dieta: pastos de gramíneas y arbustos.

Cabra enana (*Capra aegagrus hircus*)



Clase Mammalia
Subclase Theria
Infraclasse Eutheria
Orden Artiodactyla
Suborden Cetruminantia (Rumiantes)
Familia Bovidae
Subfamilia Caprinae
Capra aegagrus hircus LINNAEUS 1758

Tomada de la página oficial de Marcelle Natureza.

- Distribución: aparece por todo el mundo.
- Hábitat: zonas empinadas o rocosas.
- Dieta: hierba, pastos, hojas, hongos, líquenes, juncos.

Jineta (*Genetta genetta*)



Clase Mammalia
Subclase Theria
Infraclasse Eutheria
Orden Carnivora
Suborden Feliformia
Infraorden Viverroidea
Familia Viverridae
Genetta genetta LINNAEUS 1758

Tomada de la página oficial de Marcelle Natureza.

- Distribución: África, Península Ibérica, Francia, Palestina.
- Hábitat: típico de zonas abiertas y arboladas.
- Dieta: es omnívoro, aunque su alimento principal son otros animales como pequeños mamíferos, aves, reptiles e insectos.

Oso pardo (*Ursus arctos*)



Clase Mammalia
 Subclase Theria
 Infraclasse Eutheria
 Orden Carnivora
 Suborden Caniformia
 Infraorden Arctoidea
 Familia Ursidae
 Subfamilia (no definida)
Ursus arctos LINNAEUS 1758

- Distribución: norte de la Península Ibérica (Galicia, Asturias, Cantabria y Pirineos).
- Hábitat: bosques, zonas arbustivas o abiertas de tundra e incluso semidesiertos.
- Dieta: raíces, tubérculos, hierba, bayas, pequeños roedores, pescado y ungulados.

Wallaby de Bennet (*Macropus rufogriseus*)



Clase Mammalia
 Subclase Theria
 Infraclasse Marsupialia
 Orden Diprotodontia
 Familia Macropodidae
Macropus rufogriseus DESMAREST 1817

Tomada de la página oficial de Marcelle Natureza.

- Distribución: Australia, Nueva Guinea, Gran Bretaña, Alemania, Hawai y Nueva Zelanda.
- Hábitat: rango amplio, desde bosques tropicales hasta desiertos.
- Dieta: principalmente consume herbáceas, algunas hojas, semillas o tubérculos e incluyendo también algunos invertebrados como insectos y larvas.

4.1.2. Listado de alimentos que consumen los animales utilizados en el estudio

Tabla 1. Alimentos que componen la dieta de los diferentes animales de Marcelle Natureza.

Muestreados en Marcelle Natureza	Procedencia comercial
PIENSOS	VERDURA
Pienso de conejo	Espinacas
Pienso de gato	Zanahoria
Pienso de perro	FRUTA
Pienso équidos	Manzana
Pienso primates	Pera
Pienso rumiantes	Plátano
OTROS	PROTEÍNA ANIMAL
Heno	Carne de vaca
Hierba	Huevo
	Pollo

MÉTODOS

Todas las muestras de pelos y heces fueron recogidas, guardadas y rotuladas el día 5 de Marzo de 2015. Las heces tenían que estar lo más frescas posible y los pelos se recogieron directamente del animal o de sus refugios, para evitar su contaminación con residuos del terreno.

Al llegar al laboratorio las heces se colocaron en recipientes alimentarios de silicona dentro de una estufa a 80°C durante 24 horas (Figura 1), pues necesitan estar completamente secas para su correcta homogeneización. Transcurrido ese tiempo, cada una de las muestras se pulverizan en un mortero de piedra (Figura 2), pasando por un tamiz de 0.5 mm para separar las partes sin homogeneizar y se conservan en botes cerrados (Figura 5). Las muestras de alimentos también se dejaron secar en la estufa a 80°C durante 24 horas (Figura 3), aunque las muestras de pollo, vaca, manzana y pera necesitaron ser congeladas previamente para poder ser pulverizadas. El heno y la hierba se cortaron con unas tijeras en trozos lo más pequeños posibles (Figura 4), ya que era imposible pulverizarlos en el mortero por su consistencia fibrosa.



Fig. 1. Muestras de heces colocadas dentro de la estufa.



Fig. 2. Mortero de piedra y tamiz utilizados durante la homogenización de las muestras.



Fig. 3. Muestras de alimentos colocados dentro de la estufa para su secado.



Fig. 4. Homogenización de la muestra de heno.



Fig. 5. Tras la homogenización, todas las muestras se guardan en botes cerrados y etiquetados.

Después de cada homogenización, tanto el mortero como el tamiz se lavan para evitar que las muestras se contaminen y que los datos obtenidos sean incorrectos. Para ello se limpian con agua del grifo y jabón comercial, seguidos de acetona y agua destilada Milli-Q. Una vez que tenemos todas las muestras homogeneizadas, se trasladan a un tubo eppendorf (Figura 6), tras ser pesadas en una báscula.



Fig. 6. Muestras etiquetadas y guardadas en tubos eppendorf para ser enviadas al laboratorio.

En el caso de los pelos, antes de poder analizar su composición isotópica es necesario someterlos a un lavado con ultrasonidos (Figura 7), que se compone de varias fases. Primero se elimina la raíz del pelo y se introducen en tubos de vidrio para llevar a cabo el lavado. En la primera parte se lavan los pelos con una solución de Metanol:Cloroformo (2:1) que los cubra completamente, durante una hora. Este paso se repite otra vez más, añadiendo la misma cantidad de disolución nueva antes del segundo lavado. A continuación se realizan dos baños con agua destilada durante 20 minutos, y al igual que en la fase anterior, el agua destilada se cambia después de cada lavado. Una vez finalizado el último baño en agua, se dejan secar en una estufa a 25-30°C durante 24 horas.



Fig. 7. Muestras de pelo durante el lavado con ultrasonidos.

Una vez que todas las muestras están preparadas, se envían a la unidad de técnicas instrumentales de análisis del SAI (servicios de apoyo a la investigación) de la Universidad de A Coruña, donde se introduce una pequeña cantidad de muestra en cápsulas de estaño que serán sometidas a combustión para obtener gas puro (N_2 y CO_2). Tras este proceso, las proporciones de isótopos estables se miden mediante la realización de un análisis IRMS (espectrometría de masas para la medida de relaciones isotópicas). Con este tipo de análisis se obtiene información sobre la abundancia isotópica relativa de los elementos analizados, en este caso C y N. El análisis de las relaciones isotópicas facilita la medición de las variaciones de abundancia isotópica provocadas por los diferentes procesos a los que se someten.

El espectrómetro de masas, en muestras gaseosas, separa los iones del elemento de interés en función de la relación masa/carga, midiéndose la relación entre las señales generadas por los haces iónicos que corresponden a los isótopos pesado y ligero de la muestra y de la referencia.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados análisis IRMS de los alimentos

Tabla 2. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de los diferentes alimentos muestreados

MUESTRA	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)
Carne vaca	6,05	-21,1
Espinacas	0,91	-27,05
Heno	3,9	-29,8
Hierba	-0,4	-32,05
Huevo	4,7	-20,6
Manzana	1,85	-27,8
Pienso conejo	1,9	-25,75
Pienso équidos	2,75	-24,65
Pienso gato	5,05	-22,05
Pienso perro	4	-22,45
Pienso primates	2,7	-20,8
Pienso rumiantes	3,25	-23,3
Pan	4	-23,45
Pera	1,7	-29
Plátano	1,7	-23,4
Pollo*	2,39	-20,48
Pollo (carne)	2,65	-21,3
Pollo (grasa)	2,1	-23,8
Pollo (hueso)	2,35	-21,2
Pollo (piel)	2,25	-22,4
Zanahoria	2,95	-27,75

* Debido a que cada una de las partes del pollo tiene una composición isotópica diferente se calculó experimentalmente un solo valor que fuera representante de las diferentes proporciones isotópicas presentes en el pollo. Por ejemplo, la grasa está muy empobrecida en ^{13}C en comparación con el músculo, tal y como se observa en la tabla 2.

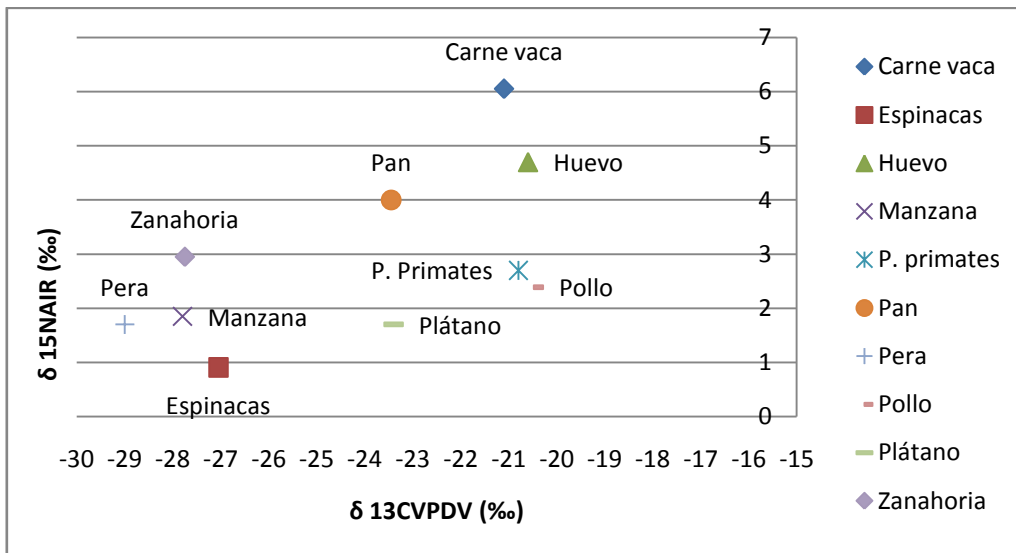


Fig.8. Valores de δ¹³C y δ¹⁵N de los alimentos que componen la dieta de los primates.

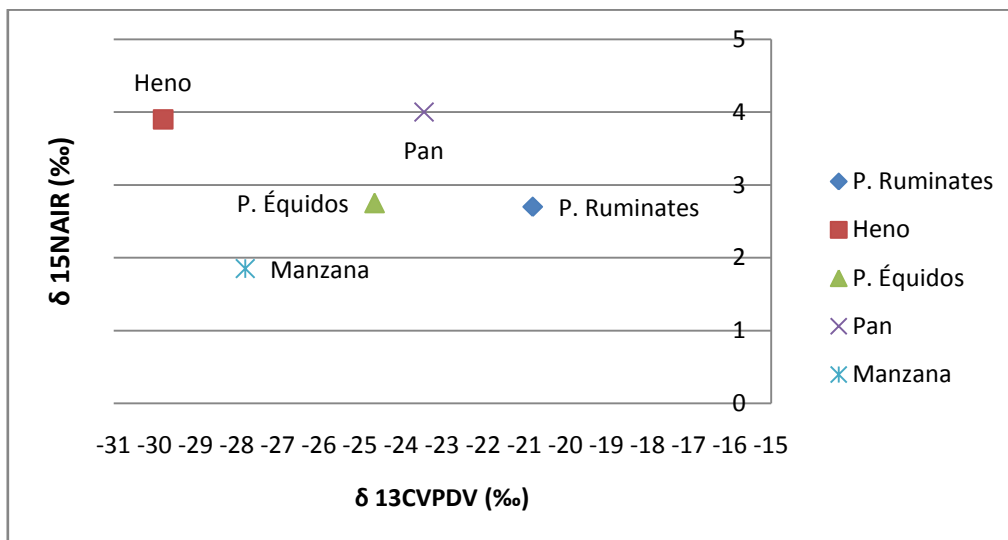


Fig.9. Valores de δ¹³C y δ¹⁵N de los alimentos que componen la dieta de los ungulados.

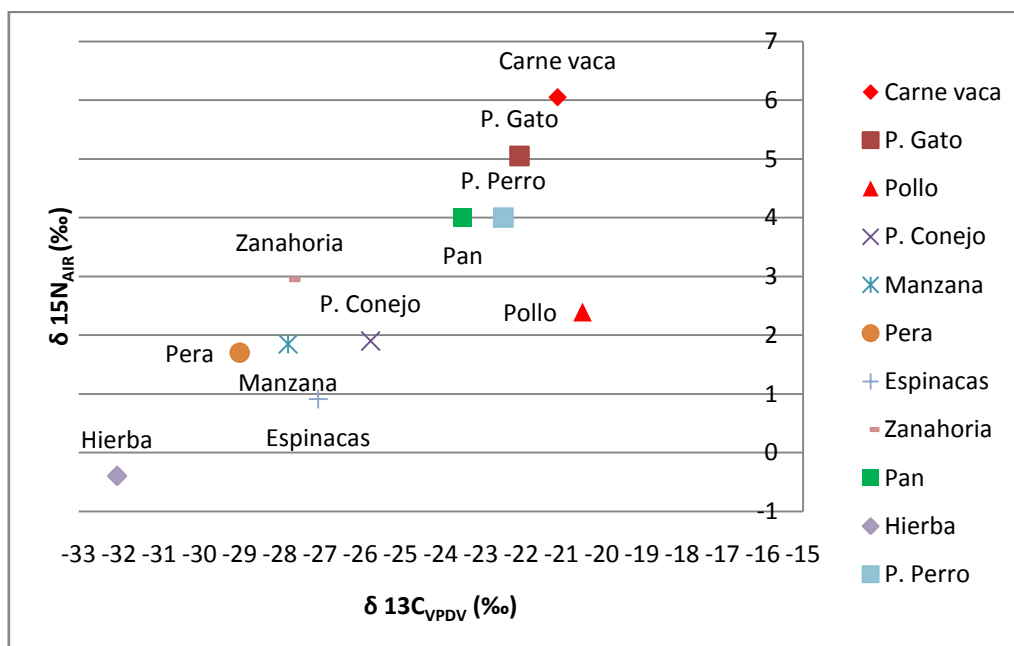


Fig.10. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de los alimentos que componen la dieta de carnívoros y omnívoros.

A partir de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de los alimentos, además de la información proporcionada por los veterinarios de Marcelle Natureza, se calcularon los valores correspondientes a la dieta de cada uno de los animales teniendo en cuenta las proporciones de cada uno de los alimentos que incluye, (ver ANEXO 1), obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 3. Valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de la dieta de cada uno de los animales. I y II corresponden a la dieta sin y con proteína animal respectivamente.

ANIMAL	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$
Babuino africano	2.174	-25.843
Lemur de cara blanca	2.236	-25.055
Lemur de cara blanca (<i>Pitu</i>)	1.94	-25.547
Macaca cangrejera I	2.070	-27.266
Macaca cangrejera II	2.52	-26.65
Mono capuchino I	2.451	-24.75
Mono capuchino II	2.65	-22.71
Burro africano	3.485	-27.3
Cabra enana	3.575	-26.65
Jineta	4.63	-21.42
Oso pardo	2.925	-25.125
Wallaby de Bennet	1.401	-28.27

Se distingue entre los dos lémures de cara blanca, porque el individuo llamado *Pitu* sufre un problema locomotor por lo que está separada del grupo y cuenta con una dieta diferente al resto de lémures.

A las macacas cangrejas y los monos capuchinos, una vez a la semana, se les añade a su dieta habitual una pequeña proporción de proteínas animales, ya sea en forma de carne de vaca, pollo o huevos. Aunque en el análisis de las heces no se refleje (el día anterior a la recogida no se añadió proteína a la dieta) en el pelo sí que

se puede observar esa modificación de la dieta, y por lo tanto, también se calculan los valores teniendo en cuenta ese añadido de proteína animal.

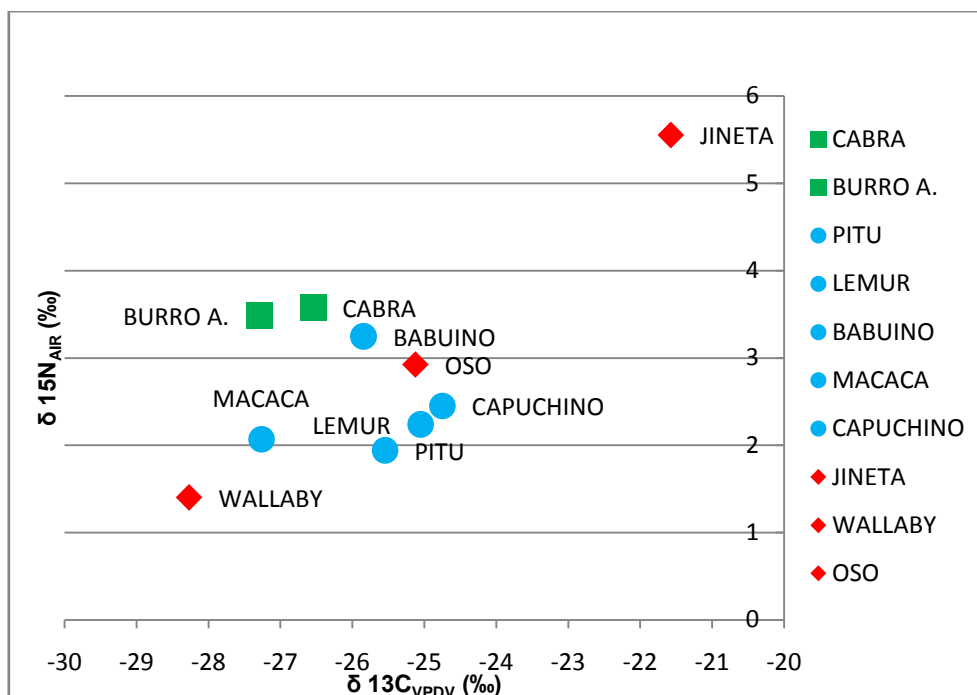


Fig.11 Representación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de la dieta de cada uno de los animales.

En la figura 11 se reflejan las diferencias que existen entre los valores isotópicos de la dieta de cada uno de los animales y como se agrupan según sus similitudes tróficas. En el centro se sitúan todos los omnívoros, los primates y el oso pardo, cuya alimentación es muy similar. Que el oso se sitúe en los mismos valores se explica porque el pienso de perro con el que se estaba alimentando incluye una parte de vegetales junto con proteínas animales. Los dos ungulados también presentan valores muy similares, mientras que la dieta del wallaby presenta unos valores más negativos debido a la ingesta de hierba, la cual cuenta con valores isotópicos empobrecidos.

5.2 Resultados análisis IRMS de las heces

Tabla 4. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de las heces.

MUESTRA	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$
Babuino	-25,95	5,05
Burro a.	-29,95	5,15
Cabra enana	-29,2	5,8
Capuchino	-21,75	4,4
Jineta	-20,95	7,7
Lemur	-23,3	3,1
Macaca	-26,55	5,4
Oso	-24,55	5
<i>Pitu</i>	-26,45	4,45
Walaby	-28,15	2,9

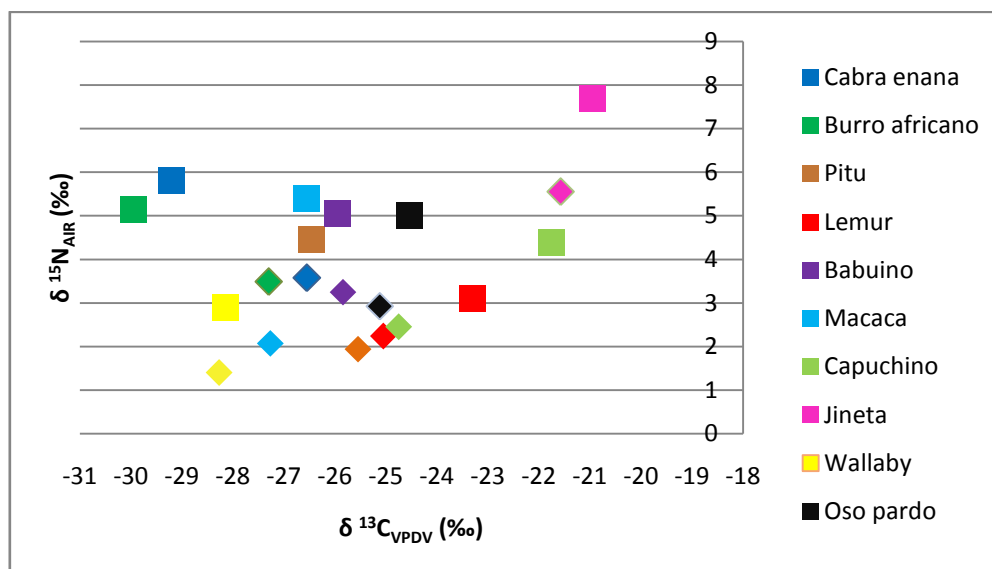


Fig.12. Variación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ entre la dieta y heces, representados por un rombo y cuadrado respectivamente.

En todas las muestras se observa un enriquecimiento variable de los valores de $\delta^{15}\text{N}$, mientras que para el $\delta^{13}\text{C}$ existen valores enriquecidos, empobrecidos o muy próximos al valor obtenido tras los cálculos de la dieta del animal. La variación en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ entre la dieta y heces se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 5. Valor del factor de fraccionamiento entre la dieta y las heces.

$\Delta^{15}\text{N}$ Dieta-heces		$\Delta^{13}\text{C}$ Dieta- Heces	
Babuino	2,88	Babuino	-0,11
Lemur	0,87	Lemur	1,75
<i>Pitu</i>	2,51	<i>Pitu</i>	-0,91
Macaca	3,33	Macaca	0,7
Capuchino	1,95	Capuchino	3
Burro africano	1,665	Burro africano	-2,65
Cabra enana	2,225	Cabra enana	-2,55
Wallaby	1,5	Wallaby	0,12
Oso pardo	2,08	Oso pardo	0,57
Jineta	3,07	Jineta	0,47
Media Primates	2,308	Media Primates	0,886
Desviación Típica	0,949	Desviación Típica	1,538

5.3 Resultados IRMS de los pelos

Tabla 6. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ del pelo.

MUESTRA	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)
Babuino	-22.3	5.25
Burro a.	-24.85	7
Cabra enana	-	-

Capuchino	-20.2	6.7
Jineta	-19.1	8
Lemur	-	-
Macaca	-21.35	5.95
Oso	-19.25	7.15
<i>Pitu</i>	-18.95	7.3
Walaby	-24.1	5.9

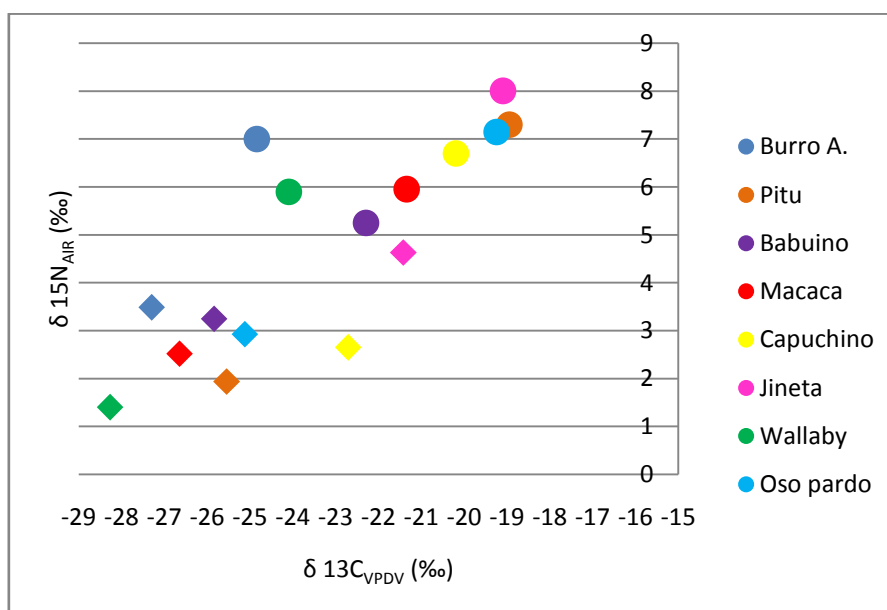


Fig.13. Variación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ entre la dieta y el pelo, representadas por un rombo y un círculo respectivamente.

En todos los casos se observa que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ para pelo están muy enriquecidos en comparación a la dieta, situándose dentro de un rango de valores que van desde aproximadamente un 3‰ a 5‰. La variación en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ entre la dieta y pelo, es decir, el valor del factor de fraccionamiento, se presenta en la tabla que se muestra a continuación:

Tabla 7. Valor del factor de fraccionamiento entre la dieta y el pelo.

$\Delta^{15}\text{N}$ Dieta-Pelo		$\Delta^{13}\text{C}$ Dieta- Pelo	
Babuino	3,08	Babuino	3,54
Lemur	-	Lemur	-
<i>Pitu</i>	5,36	<i>Pitu</i>	6,59
Macaca II	3,43	Macaca II	5,3
Capuchino II	4,05	Capuchino II	2,51
Burro africano	3,515	Burro africano	2,45
Cabra enana	-	Cabra enana	-
Wallaby	4,5	Wallaby	4,17
Oso pardo	4,23	Oso pardo	5,17
Jineta	3,37	Jineta	2,32

Media Primates 3,98
 Desviación Típica 1,003

Media Primates 4,485
 Desviación Típica 1,815

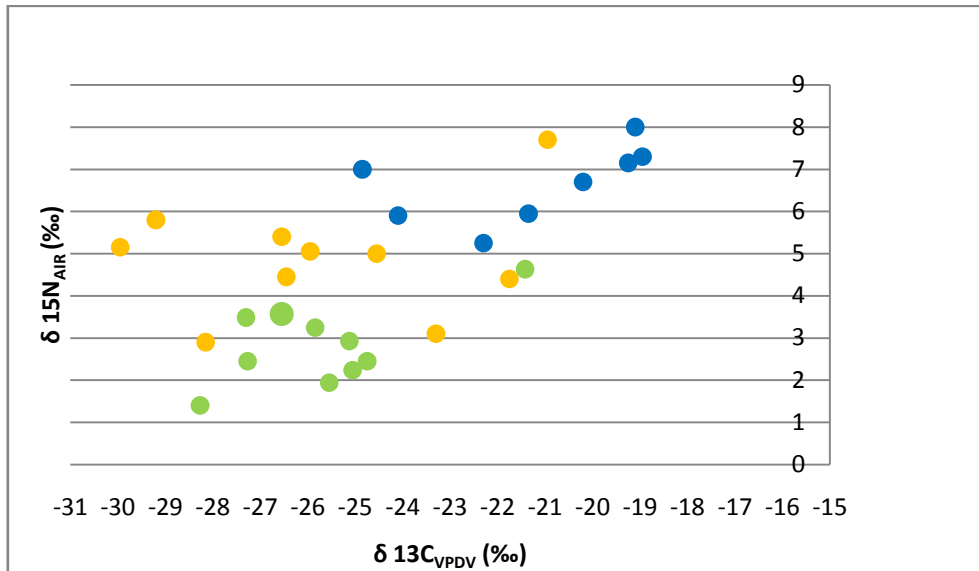


Fig.14. Relación entre los valores de los isótopos de nitrógeno y carbono en la dieta (verde), heces (amarillo) y pelo (azul).

En la figura 14 se observa que las diferentes muestras tomadas (alimentos, heces y pelo) tienen unos valores isotópicos claramente diferenciados y similares para cada tipo de muestra. Además, se demuestra que las heces tienen valores más próximos a la dieta.

6. DISCUSIÓN

En este proyecto se presenta un estudio de alimentación controlada en diferentes especies de primates, además de otras cinco especies de animales para tener una referencia de los diferentes valores que se pueden obtener dependiendo de los alimentos que ingieran. El objetivo principal es comprobar si a partir de las muestras de heces y pelo se puede averiguar la alimentación y determinar si existe, o no, un factor de fraccionamiento entre los valores isotópicos de los alimentos antes de ser ingeridos y después de pasar por diferentes rutas metabólicas. Si es así es importante conocer su valor para que los resultados no se vean alterados por esa variación.

Tras el cálculo de las dietas con las proporciones estimadas se obtiene una representación muy clara (Figura 11), donde se diferencian tres grupos tróficos: los omnívoros, los herbívoros (ungulados y wallaby de Bennet) y el carnívoro estricto; además de la existencia de valores isotópicos diferentes para cada una de las dietas dependiendo de los alimentos que incluyan.

El oso pardo al ser un omnívoro, tiene una dieta isotópicamente similar a los primates. El wallaby de Bennet presenta los valores más negativos debido a la ingesta de hierba, pues sus valores isotópicos tanto para el carbono como el nitrógeno están empobrecidos en isótopo pesado. En el caso de los ungulados, su dieta incluye heno, el cual tiene un valor de $\delta^{13}\text{C}$ más negativo, por lo que los valores de su dieta están empobrecidos para este isótopo. La jineta, un carnívoro estricto, con valores isotópicos mucho más elevados ya que su dieta está compuesta solo de proteínas animales y, cuanto mayor es el nivel trófico del que se alimenta, mayores son los valores obtenidos (Hobson y Quirk, 2014). Esto se debe a que con cada paso trófico, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ se enriquecen un 3-4‰ (Panarello *et al.*, 2006-2009).

El análisis del pelo muestra la parte que realmente se asimila de la dieta, ya que son metabólicamente inertes después de su formación, preservando el registro isotópico en el momento de su síntesis (Crawford *et al.*, 2008). En los resultados se observa un enriquecimiento de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en todas las muestras analizadas.

En los isótopos de nitrógeno el rango de valores se encuentra entre un 3-4.5‰, que se corresponde con el valor del fraccionamiento propuesto para el $\delta^{15}\text{N}$, entre un 3-4‰ por cada nivel trófico (Panarello *et al.*, 2006-2009). El mismo resultado se obtiene al calcular la media para el grupo de primates ($4\text{‰} \pm 1\text{‰}$).

Para los isótopos de carbono, el valor de enriquecimiento se encuentra entre 2-5‰. En otras publicaciones se obtienen valores muy variables de isótopos de carbono en el análisis del pelo de diferentes especies animales que puede ir desde +0.7 a +3.2‰, aunque todavía no se ha encontrado una explicación a esta variabilidad (Sponheimer *et al.*, 2003b). En el caso del lemur *Pitu* se obtiene un valor muy elevado (+6.59‰), que puede ser causado por la medicación o la diferente alimentación que recibe al estar aislado del grupo.

En los herbívoros, el enriquecimiento se encuentra entre un 2-5‰ para el carbono y entre un 3-5‰ para el nitrógeno. Estos valores se corresponden con los obtenidos en otros estudios (Sponheimer *et al.*, 2003b). Los valores menos enriquecidos para los dos isótopos se observan en la muestra del carnívoro estricto (un 3.4‰ para el nitrógeno y un 2.3‰ para el carbono) debido a que se le proporciona la cantidad y calidad necesaria de aminoácidos, por lo que no es necesario que se produzca el reciclaje de los grupos amino que es una de las causas del aumento del grado de fraccionamiento (Kurlle *et al.*, 2014).

En este proyecto se analizaron los isótopos en las heces con el fin de evaluar su potencial para la reconstrucción de la dieta de los animales. Los isótopos de carbono en las heces suelen ser similares a los de la dieta, mientras que los valores de los isótopos de nitrógeno se enriquecen (Hwang *et al.*, 2007). Los valores obtenidos en este análisis de heces muestran una pequeña variabilidad que puede ser causada por la alimentación mixta que reciben estos animales, debido a que es posible que aparezcan alimentos mal digeridos que alteren los resultados (Jones *et al.*, 1979 en Sponheimer 2003b).

Para los isótopos de carbono, los valores varían alrededor de $\pm 1\%$, por lo que los resultados son próximos al -0.9 o -0.8‰ que han sido obtenidos en otros dos estudios (Codron *et al.*, 2005a); exceptuando tres especies en los que la variación es muy llamativa. Los valores isotópicos observados para el lemur de cara blanca son los que presentan un valor con un mayor grado de variación dentro de los primates, y al ser uno de los animales de los que no se pudo obtener una muestra de pelo, no podemos determinar si el problema se encuentra en las proporciones calculadas de su dieta o no. Esa variación también se puede deber a algún alimento que ingirió el día anterior a la recogida y que no se encuentra dentro de su dieta habitual. Para estar seguros sería necesario recoger más muestras de heces y realizar un análisis continuo. Las otras dos especies, los dos ungulados, presentan valores muy empobrecidos en $\delta^{13}\text{C}$ (alrededor de -2.5‰), lo que puede ser causado por la ingesta de hierba que se encontraba en sus parcelas, pero que no forma parte de su dieta particular. Otro de los posibles motivos que puede explicar esta gran variación es que la muestra de heces es puntual, es decir, no representa la dieta ingerida durante todo el día, sino que solamente la que había ingerido antes de la recogida, pudiendo contener una mayor proporción de heno que de pienso, desviando los resultados hacia valores más negativos. Además, hay que tener en cuenta la composición variable que puede tener el heno, ya que cada una de las especies de gramíneas tienen una firma isotópica muy diferente, provocando variaciones de incluso $\pm 2\%$ (Sponheimer *et al.*, 2003b).

Los valores $\delta^{15}\text{N}$ muestran un enriquecimiento entre el 1-3‰, situándose dentro del rango establecido para las heces, puesto que la composición de isótopos de nitrógeno en las heces se enriquece constantemente entre un 0.5-3‰ (Sponheimer *et al.*, 2003a). La macaca cangrejera presenta un mayor enriquecimiento en comparación a las otras especies de primates, que puede ser debido a la dieta estricta que sigue para paliar la diarrea crónica que sufre.

7. CONCLUSIONES

Tras realizar un análisis de todos los resultados obtenidos durante la realización de este proyecto se observa que sí existen diferencias entre los valores isotópicos de la dieta de cada animal, además de que se puede distinguir entre animales herbívoros, carnívoros y omnívoros.

Tanto en el análisis de las heces como en el de los pelos se confirma la existencia de un factor de fraccionamiento que modifica los valores según los procesos por los que pasen los compuestos en cada uno de los animales.

En el caso de los pelos se observa cómo el factor de fraccionamiento es mayor que para las heces, además de que es posible determinar un valor aproximado para su dieta, es decir, se debe restar al resultado obtenido entre un 3-4.5‰ para los isótopos de nitrógeno y entre 2.3-5.3‰ para los isótopos de carbono.

En el análisis de las heces, se obtiene una gran variabilidad en los resultados de los isótopos de carbono, por lo que no se puede establecer un valor concreto para el fraccionamiento en cada grupo de animales, pero sí para cada uno de los individuos. Esto también se observa en los valores de los isótopos de nitrógeno, puesto que varían entre 1-3‰, así que tampoco se puede establecer un rango definido de valores para las heces.

Debido a estos resultados, para obtener un mejor reflejo de la dieta de cada animal y avanzar en el estudio, sería necesaria la realización de una recogida de muestras más continua en el tiempo y que la ingesta de alimento esté totalmente controlada, para poder conseguir un valor medio del factor de fraccionamiento entre la dieta y las heces.

A la vista de los resultados obtenidos con los ejemplares aislados o con dietas muy estrictas es importante que no se incluyan en futuros estudios, pues al estar recibiendo un tratamiento veterinario o al sufrir algún tipo de enfermedad no son comparables a los individuos sanos.

CONCLUSIONS

After analyzing all the food samples included in this Project, we found that there are differences between the isotopic values of each type of diet, being possible to distinguish between herbivore, carnivore or omnivore diets.

Both the analysis of feces and hairs confirmed the existence of a fractionation factor, which modifies values depending of the processes through which the food passes in each of the animals.

In the hair the fractionation factor is greater than in feces and it is possible to determine an approximate value for the diet, subtracting to the result obtained 3-4.5 ‰ for nitrogen isotopes and 2.3-5.3 ‰ for carbon isotopes.

In the analysis of feces exists a great variability in the results obtained for carbon isotopes, so we cannot set a specific value for each group of animals, but just for each of the individuals. This is also observed in the values of nitrogen isotopes, since they

vary between 1-3 ‰, so neither can establish a defined range of nitrogen values for the feces.

Because of these results, for a better reflection of the diet of each animal and for advancing in the study, it would be needed the realization of a continuous sample collection over time and that food intake were fully controlled, to achieve an average fractionation factor value between diet and feces.

In view of the results obtained with some isolated animals with special diets fully under control, it would be important to exclude such specimens in future studies because, due to the fact that they are under veterinarian treatment or suffer chronic illness, they are not comparable to healthy individuals.

8. BIBLIOGRAFÍA

Boecklen, W. J., Yarnes, C. T., Cook, B. A., James, A. C. (2011) On the Use of Stable Isotopes in Trophic Ecology, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42: 411-440

Crawford, K., McDonald, R. A., Bearhop, S. (2008) Applications of stable isotope techniques to the ecology of mammals. *Mammal Review* 38 (1): 87-107

Codron, D., Codron, J. (2009) Reliability of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in faeces for reconstructing savanna herbivore diet. *Mammalian Biology* 74: 36-48

Codron, D., Codron, J., Sponheimer, M., Lee-Thorp, J. A., Robinson, T., Grant, C.C., de Ruiter, D. (2005a) Assessing diet in savanna herbivores using stable carbon isotope ratios of faeces. *Koedoe* 48 (1): 115-124

Codron, D., Codron, J., Lee-Thorp, J. A., Sponheimer, M., de Ruiter, D. (2005b) Animal diets in the Waterberg base on stable isotopic composition of faeces. *South Africa Journal of Wildlife Research* 35 (1): 43-52

Dorst, J., Dandelot, P. (1973) Guía de campo de los mamíferos salvajes de África. Omega. Barcelona, 302pp.

Fahy, G.E., Richards, M., Riedel, J., Hublin, J. J., Boesch, C., (2013) Stable isotope evidence of meat eating and hunting specialization in adult male chimpanzees. *PNAS* 110 (15): 5829-5833

Hwang, Y. T., Millar, J.S., Longstaffe, F.J. (2007) Do $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of feces reflect the isotopic composition of diets in small mammals? *Canadian Journal of Zoology* 85: 388-396

Hobson, K. A., Quirk, T. W. (2014) Effect of age and ratio non diet-tissue isotopic ($\Delta^{13}\text{C}$, $\Delta^{15}\text{N}$) discrimination in striped skunks (*Mephitis mephitis*). *Isotopes in Environmental and Health Studies* 50 (3): 300-306

Kelly, J. F. (2000) Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology* 78: 1-27

Kurle, C. M., Koch, P. L., Tershy, B. R., Croll, D. A. (2014) The effects of sex, tissue type, and dietary components on stable isotope discrimination factors ($\Delta^{13}\text{C}$, $\Delta^{15}\text{N}$) in mammalian omnivores. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 50 (3): 307-321

Loudon, J.E., Grobler, J.P., Sponheimer, M., Moyer, K., Lorenz, J.G., Turner, T. R. (2014) Using the Stable Carbon and Nitrogen Isotope Compositions of Vervet Monkeys (*Chlorocebus pygerythrus*) to Examine Questions in Ethnoprimateology. *PLoS ONE* 9 (7): e100758

Macdonald, David W. (2010) The encyclopedia of mammals. Oxford University Press, 936pp.

Nowak, R.M. (1999) Walker's Mammals of the World (Sixth Edition). The Johns Hopkins University Press. Baltimore, 2 volúmenes, 1936 pp.

Oelze, V. M., Head, J. S., Robbins, M. M., Richards, M., Boesch, C. (2014). Niche differentiation and dietary seasonality among sympatric gorillas and chimpanzees in Loango National Park (Gabon) revealed by stable isotope analysis. *Journal of Human Evolution* 66: 95-106

Panarello, H. O., Tessone, A., Zangrando, A.F.J. (2006-2009) Isótopos estables en arqueología: principios teóricos, aspectos metodológicos y aplicaciones en Argentina. *Xama* 19-23: 115-133

Parque Zoológico Marcelle Natureza. 21-04-2015. Disponible en: <http://www.marcellenatureza.com>

Petter, Jean-Jaques and Desbordes, François (2010) Primates of the world. Princeton University press, 208pp.

Salvarina, I., Yohannes, E., Siemers, B. M., Koselj, K. (2013) Advantages of using fecal samples for stable isotope analysis in bats: evidence from a triple isotopic experiment. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27 (17): 1945-1953

SAI (Servicios de apoyo a la investigación). 07-05-15. Disponible en: <https://www.sai.udc.es/es>

Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Roeder, B., Hammer, J., Passey, B., West, A., Cerling, T., Dearing, D., Ehleringer, J. (2003a) Nitrogen Isotopes in Mammalian Herbivores: Hair $\delta^{15}\text{N}$ Values from Controlled Feeding Study. *International Journal of Osteoarchaeology* 13: 80-87

Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Passey, B., Roeder, B., Shipley, L., Lopez, E., Cerling, T., Dearing, D., Ehleringer, J. (2003b) An experimental study of carbon isotope between diet, hair, and feces of mammalian herbivores. *Canadian Journal of Zoology* 81: 871-876

Sulzman, Elizabeth W., (2007), Stable isotope chemistry and measurement: a primer. En Latja, K. y Michener, R.H. (eds.) *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Scientific: 29-49

Tykot, R.H. (2004) Stable isotopes and diet: You are what you eat. En Martini, M., Milazzo, M. y Piacentini, M. (eds.) *Proceedings of the International School of Physics "Enrico Fermi"* IOS Press, Amsterdam: 433-444

ANEXO 1

Tabla 1. Alimentos que componen la dieta del babuino africano.

Babuino africano

Alimentación	Espinacas	Zanahoria	Fruta (pera, plátano)	Manzana	Pienso primates	Total
Proporciones	20%	29%	7%	20%	24%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	0.91*0.2	2.95*0.29	$(1.7+1.7/2)*0.07$	1.85*0.2	2.7*0.24	2.174
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	-27.05*0.2	-27.75*0.29	$(-29+(-23.4)/2)*0.07$	-27.8*0.2	-20.8*0.24	-25.843

Tabla 2 .Alimentos que componen la dieta del lemur de cara blanca.

Lemur de cara blanca

Alimentación	Pienso primates	Verdura (espinacas, zanahorias)	Fruta (manzana, plátano)	Pan	Total
Proporciones	20%	35%	35%	10%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	2.7*0.2	$(0.91+2.95/2)*0.35$	$(1.35+1.7/2)*0.35$	4*0.1	2.236
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	-20.8*0.2	$(-27.05+(-27.75)/2)*0.35$	$(-27.8+(-23.4)/2)*0.35$	-23.45*0.1	-25.055

Tabla 3. Alimentos que componen la dieta de la hembra lemur de cara blanca.

Lemur de cara blanca (Pitu)

Alimentación	Fruta (manzana, pera, plátano)	Pienso primates	Total
Proporciones	80%	20%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	$(1.85+1.7+1.7/3)*0.8$	2.7*0.2	1.94
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	$(-27.8+(-29)+(-23.4)/3)*0.8$	-20.8*0.2	-25.547

Se lleva a cabo esta distinción con este individuo porque debido a un problema locomotor está separada del grupo y cuenta con una dieta diferente al resto de lémures.

Tabla 4. Alimentos que componen la dieta de la macaca cangrejera, con y sin proteína animal.

Macaca cangrejera

Alimentación	Espinacas	Zanahoria	Fruta (pera, plátano)	Manzana	Pienso primates	Total
Proporciones	20%	31%	23%	14%	12%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	0.91*0.2	2.95*0.31	(1.7+1.7/2)*0.23	1.85*0.14	2.7*0.12	2.070
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	-27.05*0.2	-27.75*0.31	(-29+(-23.4)/2)*0.23	-27.8*0.14	-20.8*0.12	-27.266

Una vez a la semana se añade una proporción de huevo, como parte de la proteína animal que ingiere, por lo que también se realiza el mismo cálculo pero con esa parte de huevo, porque aunque en el análisis de las heces no se refleje (el día anterior a la recogida no se le añadió) en el pelo sí que se puede observar esa modificación de la dieta. Por este motivo, también se calculan los valores teniendo en cuenta ese añadido de proteína animal.

Alimentación	Espinacas	Zanahoria	Fruta (pera, plátano)	Manzana	Pienso primates	Huevo	Total
Proporciones	15%	15%	30%	15%	10%	15%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	0.91*0.15	2.95*0.15	1.7*0.30	1.85*0.15	2.7*0.10	4.7*0.15	2.52
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	-27.05*0.15	-27.75*0.15	(-29+(-23.4)/2)*0.30	-27.8*0.15	-27.8*0.10	-20.6*0.15	-26.65

Tabla 5. Alimentos que componen la dieta del mono capuchino, con y sin proteína animal.

Mono capuchino

Alimentación	Verdura	Fruta (manzana, plátano)	Pan	Pienso primates	Total
Proporciones	30%	30%	20%	20%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	(0.91*2.95/2)*0.3	(1.85+1.7/2)*0.3	4*0.2	2.7*0.2	2.451
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	-27.75*0.29	(-27.8+(-23.4)/2)*0.3	-23.45*0.2	-20.8*0.2	-24.75

Al igual que con las macacas cangrejas, a los monos capuchinos se les complementa la dieta proteica añadiendo una vez a la semana huevo y un trozo de carne de vaca o de pollo. Como no coincidió la recogida con ese día, para el análisis de las heces no se tiene en cuenta. Sin embargo, como cabe la posibilidad de que en el análisis del pelo se registre esa variación se realizaron los mismos cálculos añadiendo las proporciones de huevo y carne, para comprobar posibles diferencias.

Alimentación	Verdura	Fruta (manzana, plátano)	Pan	Pienso primates	Huevo	Carne	Total
Proporciones	25%	25%	5%	10%	15%	15%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	$(0.91+2.95/2)*0.25$	$(1.85+1.7/2)*0.2$	$4*0.05$	$2.7*0.1$	$4.7*0.15$	$4.22*0.15$	2.65
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	$(-27.05+(-27.75)/2)*0.25$	$(-27.8+(-23.4)/2)*0.25$	$-23.45*0.05$	$-20.8*0.1$	$-20.6*0.15$	$-20.79*0.15$	-22.71

Tabla 6. Alimentos que componen la dieta del burro africano.

Burro africano

Alimentación	Pienso équidos	Heno	Pan	Manzana	Total
Proporciones	20%	50%	20%	10%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	$2.75*0.2$	$3.9*0.5$	$4*0.2$	$1.85*0.1$	3.485
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	$-24.65*0.2$	$-29.8*0.5$	$-23.45*0.2$	$-27.8*0.1$	-27.3

Tabla 7. Alimentos que componen la dieta de la cabra enana.

Cabra enana

Alimentación	Pienso rumiantes	Heno	Total
Proporciones	50%	50%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	$3.25*0.5$	$3.9*0.5$	3.575
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	$-23.3*0.5$	$-29.8*0.5$	-26.65

Tabla 8. Alimentos que componen la dieta de la jineta.

Jineta

Alimentación	Pienso gato	Carne (vaca/pollo)	Total
Proporciones	50%	50%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	$5.05*0.5$	$(2.39+6.05/2)*0.5$	4.63
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	$-22.05*0.5$	$(-20.48+(-21.1)/2)*0.5$	-21.42

Tabla 9. Alimentos que componen la dieta del oso pardo en invierno.

Oso pardo

Alimentación	Pienso perro	Manzana	Total
Proporciones	50%	50%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	$4*0.5$	$1.85*0.5$	2.925
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}} (\text{‰})$	$-22.45*0.5$	$-27.8*0.5$	-25.125

Tabla 10. Alimentos que componen la dieta del wallaby de Benett.

Wallaby de Benett

Alimentación	Pienso conejo	Fruta (manzana, pera)	Verdura (espinacas, zanahorias)	Pan	Hierba	Total
Proporciones	20%	20%	20%	10%	30%	100%
$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	1.9*0.2	(1.85+1.7/2)*0.2	(0.91+2.95/2)*0.2	4*0.1	-0.4*0.3	1.401
$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)	-25.75*0.2	(-27.8+(-29)/2)*0.2	(-27.05+(-27.75)/2)*0.2	-23.45*0.1	-32.05*0.3	-28.27