



digitAR

queologia
chaeology

ig
it
al

q u i t e c t u r a
c h i t e c t u r e
t e s t s

digitAR - Revista Digital de Arqueologia, Arquitectura e Artes
Digital Journal of Archaeology, Architecture and Arts

ESTUDIO PRELIMINAR DE ESTACIONALIDAD UTILIZANDO DIENTES DE FAUNA MEDIANTE ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER

PRELIMINARY STUDY OF SEASONALITY USING FAUNA TEETH BY ANALYSIS OF PLASMA SPECTROSCOPY INDUCED BY LASER

A. J. Sánchez Flores

Departamento de Prehistoria. Facultad de Geografía e Historia. Universidad Complutense. Madrid, España

A. Marín-Roldán

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense. Madrid, España

J. Yravedra

Departamento de Prehistoria. Facultad de Geografía e Historia. Universidad Complutense. Madrid, España

J. O. Caceres

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense. Madrid, España

RESUMEN

Los estudios de estacionalidad se han desarrollado durante mucho tiempo, con diferentes métodos, sin que ninguno de ellos haya demostrado ser resolutivo. En este trabajo se propone una alternativa a los métodos directos estacionales mediante la aplicación de una nueva metodología basada en la técnica de espectroscopia de ablación láser: LIBS. Esta técnica de análisis se ha aplicado a 54 cuartos premolares deciduales (DP4) de cerdos, y los datos obtenidos tras el análisis de los elementos Mg, Na e H α arrojan un índice de correlación de 0,66 ($R^2=0,66$), lo que sugiere unas perspectivas prometedoras para el futuro desarrollo de esta metodología aplicada al estudio de la estacionalidad.

Palabras clave: Estacionalidad, LIBS, Bioarqueología, Zooarqueología.

ABSTRACT

Seasonal studies have been developed for a long time, with different methods, without any of them having proved to be conclusive. In this paper, an alternative to seasonal direct methods is proposed by the application of a new methodology based on the technique of laser ablation spectroscopy: LIBS. This technique of analysis was applied to 54 quarters premolar (DP4) of pigs, and the data obtained after the analysis of the elements Mg, Na and H α yield a correlation index of 0.66 ($R^2 = 0.66$), suggesting promising prospects for the future development of this methodology applied to the study of seasonality.

Key words: Seasonality, LIBS, Bioarchaeology, Zooarchaeology.

1. INTRODUCCIÓN.

Los estudios de estacionalidad aplicados al análisis de emplazamientos arqueológicos se centran en responder a cuestiones relativas al momento del año en el que se ocupó un yacimiento. Para ello, se han ideado una serie de técnicas que han sido divididas por algunos autores en dos bloques (Monks 1981 y Mateos Cachorro 2001): estudios de estacionalidad por métodos indirectos y directos.

MÉTODOS INDIRECTOS. De ellos, destacar los siguientes. El primero, el análisis químico del suelo, que consiste en el estudio del sedimento para encontrar los rastros químicos de cualquier sustancia (excrementos, grasas animales, etc.) que den información sobre marcadores estacionales particulares. El segundo está relacionado con la etología de los herbívoros y sus movimientos estacionales, como por ejemplo, la movilidad que experimentan estos buscando pastos de montaña en verano y pastos en zonas bajas en los momentos rigurosos del año.

MÉTODOS DIRECTOS. Se basan en el estudio de los restos de fauna presentes en el yacimiento. Por ejemplo, mediante el análisis de las cornamentas de cérvidos, la erupción de piezas dentarias, la fusión de epífisis o el estado de desgaste dentario a través de análisis variados, como el mesodesgaste o el microdesgaste.

Más interesantes son los estudios basados en las estructuras de crecimiento de la fauna, como los otolitos en los peces, las conchas de los moluscos o el estudio del cemento dentario de los mamíferos. Sin embargo, todas estas técnicas presentan limitaciones, o bien porque en algunos casos solo son aplicables a individuos inmaduros —emergencia de dientes, sustitución de piezas dentarias—, o bien porque solo sirven para individuos adultos —cementocronología— o para ciertos sexos, como las cornamentas en los machos de cérvidos, y en la mayor parte de ellos los resultados que ofrecen siguen mostrando una gran amplitud estacional (verano-otoño, invierno-primavera). En este trabajo se propone un análisis pionero sobre una muestra actual utilizando una técnica alternativa, el

método LIBS (*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*). El objetivo de este trabajo es tratar de paliar las limitaciones de las técnicas tradicionales, verificando la viabilidad de la metodología LIBS para el análisis estacional. De cumplirse con el objetivo, se propondría la técnica LIBS como un posible método alternativo para los estudios de estacionalidad.

2. EL MÉTODO LIBS: ESPECTROSCOPIA DE ABLACIÓN LÁSER.

La técnica LIBS (Lie *et al.* 2006; Hahn y Omenetto 2010; Marcos Martínez *et al.* 2011; Haider y Khan 2012; Marín Roldán *et al.* 2013) se basa en la vaporización de una pequeña porción de la superficie de la muestra por la interacción con un pulso láser de alta energía, generando un plasma que emite una radiación correspondiente a los elementos presentes en ella. Por tanto, se obtiene un espectro que indica la composición elemental de la muestra (Figura 1). La cantidad de muestra vaporizada es del orden de los microgramos, por lo que se considera una técnica microdestructiva.

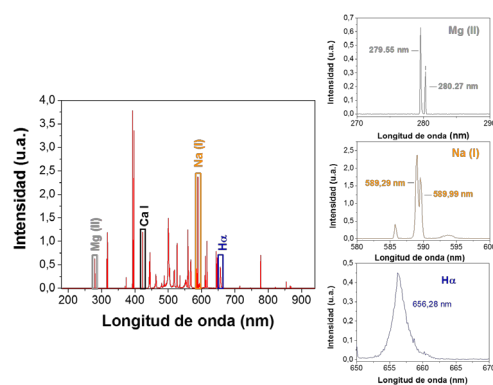


Figura 1- Espectro tipo de uno de los promedios de pulsos obtenidos, con la identificación de los elementos elegidos para el análisis: Mg II (gris), Na I (naranja) e H α (azul) y Ca I (negro), este último usado únicamente como patrón interno. A la derecha, ampliación de los mismos elementos con sus respectivas longitudes de onda.

Las ventajas más destacables de la metodología LIBS son: poca o nula preparación de la muestra; análisis rápido, multielemental y en cualquier

estado de agregación de la materia; y microdestrucción de la muestra. El desarrollo del análisis experimental se ha realizado con un láser de Nd: YAG (Figura 2) con Q-switch activo (Quantel, modelo Brio) que opera a 1064 nm, con una duración del pulso de 4 ns. El diámetro del haz es de 4 mm y la divergencia de 0,6 mrad. Las muestras se colocaron sobre un posicionador micrométrico X-Y-Z manual con una etapa de 0,5 mm de desplazamiento en cada coordenada para asegurar que cada pulso del láser incidía con precisión sobre el área seleccionada de la superficie dental. El haz láser se concentra en la superficie del diente con 100 mm de diámetro. Esta distancia de trabajo permite una fácil recolección y manipulación del plasma mientras que el enfoque proporciona una colocación precisa del haz sobre la muestra. La energía del pulso se ajusta a 20 mJ, y la frecuencia a 1 Hz. El intervalo de longitudes de onda utilizado fue 180 a 940 nm. El tiempo de integración del detector se ajustó a 20 ms. Para evitar la detección de la radiación de frenado (bremstralung), el detector se activa con un tiempo de retardo de 0.8 ms entre el pulso de láser y la adquisición del espectro.

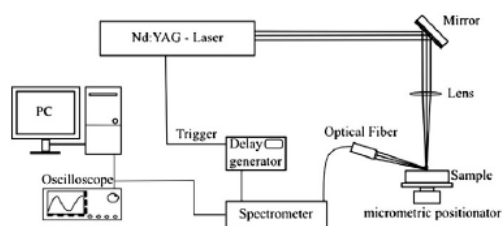


Fig. 1. The experimental setup, including a Nd:YAG laser, a delay generator, a micrometric

Figura 2- Configuración experimental (set up) de un sistema láser de Nd: YAG (Marín Roldán 2013).

3. MUESTRAS.

La investigación se realizó con muestras dentales de cerdos (*Sus scrofa domestica*) infantiles, provenientes de un matadero industrial con licencia y todos los certificados necesarios en el cumplimiento de los requisitos formales de la Unión

Europea. Estas muestras fueron criadas en los municipios de Crespos, Fontiveros y Flores de Ávila, en la comarca de La Moraña (Ávila) y destinados únicamente al consumo humano. Las muestras utilizadas en el presente estudio son dientes inferiores de cerdos infantiles, en concreto cuartos premolares deciduales (DP4), que aún estaban insertos en el hueso alveolar de la mandíbula. La totalidad de los individuos analizados tenían el M1 emergido y en algunos casos el alveolo del M2 empezaba a abrirse. Las mandíbulas fueron sometidas a un proceso de descarnación en el matadero. A continuación, se dejaron limpiar mediante métodos naturales de exposición al aire libre durante un periodo de seis meses y luego se procedió a su estudio en el laboratorio. El periodo que abarcan las muestras transcurre desde noviembre de 2013 a octubre de 2014, a excepción del mes de junio de 2014, durante el cual no se sacrificaron cerdos en el matadero. Cada mes de muestras incluía cinco individuos diferentes —excepto marzo, que sólo incluía cuatro individuos—, y de cada uno de ellos se extrajo el cuarto premolar decidual (DP4). El motivo de esta elección reside en que era el único diente lo suficientemente desarrollado como para llevar a cabo un análisis viable, debido a que el resto estaba en proceso de erupción o, como el M1, la posición oclusal todavía no había sido completada totalmente. Así, el número total de dientes asciende a cincuenta y cuatro (54). Una vez extraídos, los dientes fueron analizados directamente a temperatura ambiente y sin preparación alguna mediante LIBS.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Utilizando la base de datos del NIST, se identificaron las siguientes líneas espectrales, correspondientes a los elementos más representativos de la composición elemental de la muestra: Mg II (279,55 nm y 280,27 nm), Na I (589,29 nm y 589,99 nm), Ha (656,28 nm) y Ca I (422,67 nm). Esta última línea fue utilizada como "patrón interno", realizándose todas las relaciones elementales con respecto a ella (Figura 1).

En primer lugar, se realizó un análisis previo para la optimización de los parámetros del láser y la recogida de espectros. Para ello, se utilizó un M1 escogido al azar. Se realizaron tres series diferentes de promedios de cinco, diez y quince pulsos, precedidas siempre por tres pulsos de limpieza, que no se tuvieron en cuenta para el promedio de la posición. A continuación, se calculó la desviación estándar de cada serie, siendo el error de cada una mínimo y despreciable. Por tanto, para todos los análisis posteriores, se recogieron espectros de promedios de cinco pulsos, más tres pulsos de limpieza previos (Figura 3).

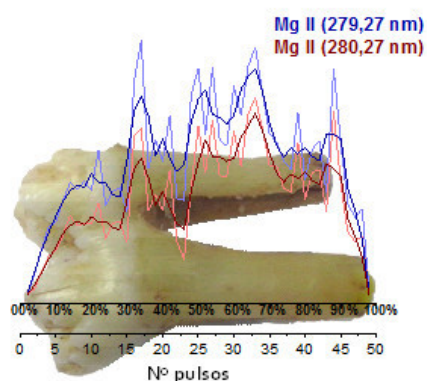


Figura 3- Gráfica del M1 usado como prueba para la optimización de los parámetros del láser. Montaje creado para escenificar el cambio de intensidad de las líneas espectrales de Mg II a lo largo del diente, desde la corona hasta la raíz, y su división en porcentajes para el análisis de los datos.

Este análisis también sirvió para comprender el comportamiento del Mg II. Dicho elemento produce un doblete, es decir, emite dos líneas espectrales a diferentes longitudes de onda. Sin embargo, la variación de ambas líneas espectrales es idéntica; luego cualquiera de las dos es apropiada para el estudio. Así, se eligió la primera para realizar la investigación: Mg II (279,55 nm) (Figura 3). El Na I también producía un doblete, por lo que se llevó a cabo la misma operación con este elemento. El análisis se desarrolló a lo largo de la raíz de cada diente, por lo que se obtuvieron

espectros de cada posición, desde la corona hasta el ápice. Debido a la diferente longitud de las muestras, tras la finalización de los análisis los dientes se dividieron en partes porcentuales, para así poder comparar los espectros equivalentes a la posición exacta del diente (Figura 3). Paralelamente, también fue necesario recoger los datos de temperatura de la zona de cría de los cerdos, proporcionados por la AEMET (Agencia Estatal de Meteorología). Estos datos muestran las variaciones diarias de T° registrados en la comarca de La Moraña a lo largo de los años 2013 y 2014 para la estación meteorológica de Mirueña-Embalse el Milagro (la representación gráfica de la T° se encuentra incluida en la Figura 4).

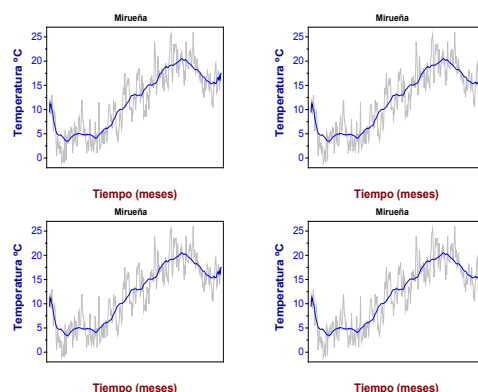


Figura 4- Gráficas de los datos de los dientes superpuestas a las de la temperatura de la estación de Mirueña: las tres primeras gráficas muestran la de los porcentajes del 60%, el 80% y el 50% del Mg II, la cuarta muestra la posible relación inversa para el porcentaje del 80% del Ha (ordenadas de mayor a menor índice de correlación (R^2)).

Una vez obtenidos los resultados de los 2.076 espectros, se realizó la proyección gráfica de la T° y de los datos de intensidad espectrales para cada elemento analizado (Mg II, Na I y Ha) de los dientes de los cinco individuos de cada mes para todo el año de muestra. Lo que puede observarse en un primer análisis es una variación de los elementos presentes en el diente a lo largo del año en función de la T° (Figura 4). En este sentido, se puede comprobar cómo cuando la temperatura asciende, el Mg II

parece seguir la misma tendencia, lo que puede sugerir una relación directamente proporcional entre ambas variables. En cambio, para el elemento Ha, la relación parece ser inversa (Figura 4). Además, la relación entre ambas variables se hace más precisa según el elemento que se elija. A este respecto, después de analizar el conjunto de 99 gráficas obtenidas de los tres elementos, el Mg II (279,55 nm) ha sido el que mejores resultados ha proporcionado, seguido del Ha (656,28 nm) y siendo el último el Na I (589,29 nm). De hecho, esta relación no solo cambia dependiendo del elemento, sino también dependiendo del porcentaje del que se trate dentro de cada elemento. Así, de los 99 índices de correlación realizados, los cuatro mejores fueron los relativos al 60% del Mg II ($R^2=0,66$), seguido del 80% ($R^2=0,48$) y del 50% ($R^2=0,40$) para este mismo elemento, siendo el menor el del 80% del Ha (656,28 nm) ($R^2=0,39$). Por otro lado, en la figura 5 se puede apreciar la estacionalidad de forma mucho más directa. En estas gráficas se comprueba perfectamente la variación de los elementos Mg II (279,55 nm) y Ha (656,28 nm) con respecto al momento del año, coincidiendo exactamente con la estación indicada por los datos de la AEMET.

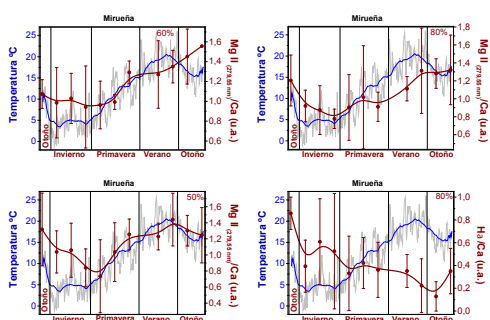


Figura 5- División por estaciones de las gráficas de la figura 3 para relacionar los datos de dientes y de la T^a con la estacionalidad.

Sin embargo, tanto en la Figura 4 como en la Figura 5 se puede constatar que ambas líneas no coinciden perfectamente, produciéndose un

aparente desplazamiento a la derecha de la línea elemental con respecto a la de la T^a . Este desplazamiento podría estar indicando que quizás, el motivo por el que ambas líneas no coinciden exactamente sea por un posible retardo en la absorción del elemento en el diente, provocado tal vez por la constante temperatura a la que se mantiene la boca del individuo. En futuros análisis, se tratará de precisar si efectivamente esta ligera diferencia está relacionada con una absorción retardada del elemento, y en caso afirmativo, intentar ver cuánto tiempo tarda en ser absorbido. Por otro lado, aunque *a priori* pudiera parecer que los índices de correlación obtenidos son insignificantes, hay que tener en cuenta que no se conoce ningún precedente de este pionero análisis. De hecho, la única referencia a un caso similar está en los índices de correlación entre el Mg/Ca y las TSM (*Temperatura de la Superficie del Mar*) obtenidos por García Escárzaga *et al.* (2015) para moluscos marinos utilizando LIBS, los cuales no fueron superiores al 0,4 en el mejor de los casos. Además, son muestras procedentes de organismos vivos, lo que implica que están sujetas a la acción de factores internos y externos que desconocemos y que no están bajo nuestro control — como pudiera ser las hormonas que afectan al estado del desarrollo, el estado reproductivo, el sexo, etc. Por tanto, un índice máximo del 0,66 ($R^2=0,66$) se puede considerar como un excelente dato. Por último, puede que los índices de correlación estén indicando que la relación entre las temperaturas y los datos de los elementos no sea lineal, sino de otra naturaleza.

5. CONCLUSIONES.

En esta investigación se ha demostrado la existencia de cierta variabilidad de los elementos estudiados y presentes en el diente en función de la T^a registrada; variabilidad que puede depender de la estacionalidad. Además, de los tres elementos analizados, el Mg II (279,55 nm) ha sido el más representativo de todos. En esta línea, dentro de un mismo elemento, existen partes del diente

más diagnósticas que otras, como evidencia el índice de correlación del 60% para el Mg II (279,55 nm) ($R^2=0,66$). Por tanto, basándonos en estos resultados, se puede concluir que se ha demostrado la viabilidad, validez y funcionalidad de la técnica LIBS, evidenciando el gran potencial para los estudios de estacionalidad, proporcionando un posible método alternativo a los métodos tradicionales. Además, puede abrir la puerta no solo a los estudios de estacionalidad, sino también a estudios de paleotemperaturas, ya que esta metodología podría aunar ambas disciplinas. Aún así, y a pesar de las grandes ventajas que aporta el método LIBS —fundamentalmente la rapidez en la obtención de los datos, y la prácticamente nula destrucción de la pieza arqueológica o la reducción de costes frente a otros métodos—, y a los prometedores datos obtenidos en este estudio preliminar —unos índices de correlación de $R^2= 0,65$ nada despreciables para el Mg II (279,55 nm)— es evidente que es necesario continuar con el estudio de los datos obtenidos mediante esta metodología antes de su aplicación sobre materiales arqueológicos, pues los índices de correlación nos podrían indicar que existen factores externos que afectan a la incorporación del Mg II (279,55 nm) y del Ha (656,28 nm), o incluso que puedan ser indicativos de una relación no lineal entre ambas variables. Cuestiones, por tanto, que deberán ser tratadas en posteriores publicaciones de trabajos actualmente en proceso, que podrán evaluar en un futuro de manera más precisa la utilidad de la metodología en zooarqueología.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- García Escárzaga, A.; Moncayo, S.; Gutiérrez Zugasti, I.; González Morales, M. R.; Martín-Chivelet, J.; Cáceres, J. O. 2015. "Mg/Ca ratios measured by laser induced breakdown spectroscopy (LIBS): a new approach to decipher environmental conditions". *J. Anal. At. Spectrom.*, 30: 1913-1919. DOI: 10.1039/C5JA00168D
- Hahn, D. W.; Omenetto, N. 2010. "Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part I: Review of basic diagnostics and plasma-particle interactions: Still-challenging issues within the analytical plasma community". *Appl. Spectrosc.*, 66: 347-419.
- Haider, A. F. M. Y.; Khan, Z. H. 2012. "Determination of Ca content of coral skeleton by analyte additive method using the LIBS technique". *Optics & Laser Technology*, 44: 1654-1659.
- Lie, T. J.; Kurniawan, K. H.; Kurniawan, D. P.; Pardede, M.; Suliyanti, M. M.; Khumaeni, A.; Natiq, S. A.; Abdulmajid, S. N.; Lee, Y. I.; Kagawa, K.; Idris, N.; Tjia, M. O. 2006. "Elemental analysis of bead samples using a laser-induced plasma at low pressure". *Spectrochimica Acta Part B*, 61: 104-112.
- Marcos Martínez, D.; Ayala, J. A.; Izquierdo Hornillos, R. C.; Manuel de Villena, F. J.; Cáceres, J. O. 2011. "Identification and discrimination of bacterial strains by Laser Induced Breakdown Spectroscopy and neural networks". *Talanta*, 84: 730-737.
- Marín Roldán, A.; Manzoor, S.; Moncayo, S.; Navarro Villoslada, F.; Izquierdo Hornillos, R. C.; Cáceres, J. O. 2013. "Determination of the postmortem interval by Laser Induced Breakdown Spectroscopy using swine skeletal muscles". *Spectrochimica Acta Part B* 88: 186-191.
- Mateos Cachorro, A. 2002. "Apuntes sobre estacionalidad y subsistencia de los grupos humanos del Cantábrico Occidental en torno al 13000 B.P." *Trabajos de Prehistoria*, 59(2): 27-41.
- Monks, G. G. 1981. "Seasonality studies". En Schiffer, M. (Ed.): *Advances in Archaeological Method and Theory*, vol. 4: 177-240. New York: Academic Press.
- NIST, Atomic Spectroscopy Information [cited 9 de mayo de 2015]: <http://www.nist.gov/atomicspectroscopy.cfm>