



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**USO DE ISÓTOPOS ESTABLES DE CARBONO  $^{12}\text{C}$  Y  
 $^{13}\text{C}$  EN LA DETERMINACIÓN DE PALEODIETAS DE  
MAMÍFEROS CENOZOICOS. CONCEPTOS BÁSICOS  
Y UNA PROPUESTA DE ESTUDIO.**

**SEMINARIO DE TITULACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**RODRIGO BUSTILLO RAMÍREZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MARISOL MONTELLANO BALLESTEROS**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del Alumno.

Apellido paterno: Bustillo  
Apellido materno: Ramírez  
Nombre(s): Rodrigo  
Teléfono: 50 25 90 15  
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad o escuela: Facultad de Ciencias  
Carrera: Biología  
No. de cuenta: 300334722

### 2.- Datos del Tutor.

Grado: Dra.  
Nombre(s): Marisol  
Apellido paterno: Montellano  
Apellido materno: Ballesteros

### 3.- Datos del Sinodal 1.

Grado: Dr.  
Nombre(s): Enrique  
Apellido paterno: Martínez  
Apellido materno: Hernández

### 4.- Datos del Sinodal 2.

Grado: M. en C.  
Nombre(s): Edith  
Apellido paterno: Cienfuegos  
Apellido materno: Alvarado

### 5.- Datos del Sinodal 3.

Grado: M. en C.  
Nombre(s): Alejandro  
Apellido paterno: Cristín  
Apellido materno: Ponciano

### 6.- Datos del Sinodal 4.

Grado: M. en C.  
Nombre(s): Ramiro  
Apellido paterno: Cruz  
Apellido materno: Durán

### 7.- Datos del Trabajo Escrito.

Título: Uso de isótopos estables  $^{12}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  en la determinación de paleodietas de mamíferos cenozoicos.  
Conceptos básicos y una propuesta de estudio.  
Número de páginas: 19 p.  
Año: 2009

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia: mis padres y mi hermana. Gracias a su esfuerzo y generosidad pude culminar este ciclo con confianza y calma.

Agradezco a mi tutora, la Dra. Marisol Montellano Ballesteros, por la paciencia y generosidad que siempre ha demostrado, no sólo a mi si no a mis compañeros de la Facultad de Ciencias. ¡De verdad, gracias Marisol!

A mis sinodales, Dr. Enrique Martínez Hernández, M. en C. Edith Cienfuegos Alvarado, M. en C. Alejandro Cristín Ponciano y M. en C. Ramiro Cruz Durán, les agradezco su profesionalismo y enseñanza, así como los gestos de amistad que me brindaron durante este proceso.

A la Dra. Sara Frías Vázquez y a la Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez les agradezco el que me hayan apoyado desde un inicio, incluso aunque al final no pudieran pertenecer en la lista oficial de sinodales. Me honra de gran manera el que hayan tenido el deseo de participar en este escrito de una forma tan entusiasta.

Por último, aprovecho para agradecer a todas aquellas trabajadoras de la Facultad de Ciencias, en especial a las pertenecientes al Departamento de Biología y al área de Titulación quienes en más de una ocasión realizaron verdaderos actos heroicos en pro de mi titulación.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	4
Objetivo .....	5
MARCO TEÓRICO .....	6
Plantas C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> y CAM .....	6
Isótopos estables de carbono en plantas .....	7
Isótopos estables de carbono en animales .....	8
Isótopos estables de carbono en el esmalte .....	8
Metodología para el análisis isotópico del esmalte fósil .....	8
Toma de muestras .....	9
Tratamiento de la muestra .....	9
Descripción de la proporción isotópica de la muestra .....	10
Limitaciones y consideraciones .....	12
Para la toma y tratamiento de la muestra .....	12
Para el cálculo de la proporción isotópica de la muestra .....	12
Para la interpretación de los resultados .....	13
PROPUESTA DE ESTUDIO: Hábitos Alimenticios de <i>Equus conversidens</i> por medio del análisis de isótopos estables de carbono <sup>12</sup> C y <sup>13</sup> C .....	14
Introducción .....	14
Caballos pleistocénicos mexicanos .....	14
Objetivo .....	15
Material y Método .....	15
Hipótesis .....	15
REFERENCIAS .....	17

## INTRODUCCIÓN.

Los isótopos estables de carbono  $^{12}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  son componentes comunes en el ambiente. Estos pueden encontrarse en la atmósfera terrestre y en substratos rocosos como la caliza (Nier y Gulbransen, 1939, en Ehleringer y Rundel, 1989). A través de las diferentes reacciones fotosintéticas de los consumidores primarios, éstos son integrados a las redes tróficas del ecosistema en forma de componentes del tejido vegetal y, posteriormente, animal.

La existencia de isótopos estables de carbono en plantas fue documentada por primera vez por Craig en 1953 en el artículo titulado “The geochemistry of stable carbon isotopes” (Craig, 1953) en donde se muestra el análisis isotópico de diferentes materiales, incluidos tejidos vegetales, a través del uso del espectrómetro de masas. Craig señaló que las plantas obtienen los isótopos de carbono del  $\text{CO}_2$  atmosférico. Aún así, a pesar de esta relación, notó que los valores isotópicos del tejido vegetal eran diferentes a los valores atmosféricos (Craig, 1954). En sus estudios, Craig nunca pudo explicar el por qué de esta diferencia.

En 1960, Park y Epstein demostraron la existencia de una selección en contra del isótopo  $^{13}\text{C}$  al trabajar con plantas de tomate. Ellos identificaron a la enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa (rubisco) como la principal causante de esta selección (Park y Epstein, 1960). Así mismo, explicaron que la diferencia entre los valores isotópicos de la atmósfera y los del tejido vegetal es ocasionada por la actividad de la enzima rubisco.

Posteriormente, a mediados de la década de los 60 e inicios de los 70, se identificaron los metabolismos vegetales  $\text{C}_4$  y CAM (Ehleringer y Rundel, 1989). Aunados al ya conocido metabolismo  $\text{C}_3$ , fueron establecidos como los tres metabolismos vegetales que conocemos en la actualidad. En la misma década, Bender (1968) y Smith y Epstein (1971) señalaron que cada metabolismo posee una proporción isotópica específica y que es posible identificarlos usando análisis de isótopos estables de carbono.

Respecto a los tejidos de origen animal, los estudios realizados por Minson *et al.* (1975) y Haines (1976) fueron los primeros en mostrar no sólo la presencia de una proporción isotópica en el tejido si no también una posible relación con la dieta consumida. Dos años después, DeNiro y Epstein (1978) corroboraron la existencia de una relación directa entre la dieta del animal y la proporción isotópica del mismo utilizando animales criados en el laboratorio con dietas controladas. También señalaron la existencia de enriquecimientos o variaciones en la cantidad del isótopo  $^{13}\text{C}$  en diferentes tejidos animales, sin embargo las razones eran desconocidas (DeNiro y Epstein, 1978).

Este trabajo fomentó la aparición de nuevos estudios a lo largo de la década de los ochentas, los cuales se enfocaron en discernir la dieta de diferentes animales a través del análisis isotópico del colágeno presente en hueso y pelo de los individuos. Estos estudios fueron realizados principalmente por N. J. van der Merwe, J. C. Vogel y S. H. Ambrose (Cerling y Harris, 1999).

El uso de los dientes en los estudios isotópicos fue introducido más tarde por Lee-Thorp y van der Merwe (1987) quienes mostraron que el esmalte puede utilizarse para obtener huellas isotópicas. Esta idea fue impulsada nuevamente en 1992, cuando Quade y sus colaboradores demostraron la capacidad de este tejido para resistir procesos diagenéticos y de fosilización (Quade *et al.*, 1992).

En los años siguientes, las técnicas de análisis isotópicos fueron refinadas por diversos autores como Benjamin Passey y Thure Cerling. Junto con John Harris, este último autor identificó y publicó

los grados de enriquecimiento del isótopo  $^{13}\text{C}$  para el esmalte de mamíferos de mediano y gran tamaño, permitiendo obtener resultados más certeros en animales como caballos o elefantes con mayor exactitud (Cerling y Harris, 1999). De igual forma, se han estudiado los procesos de formación del esmalte (Passey y Cerling, 2002) y han publicado modelos apropiados para la interpretación de los datos en estudios que pretenden realizar análisis dietarios y observar el cambio de la dieta en el transcurso de meses (Passey y Cerling, 2005).

Recientemente, la mayor cantidad de estudios paleontológicos que han utilizado dientes fósiles para el análisis isotópico han sido realizados por Thure Cerling y Bruce McFadden. Estos estudios se han enfocado en discernir dietas de antiguos herbívoros (McFadden, 2000), identificar paleo nichos (McFadden *et al.*, 2004) y entender distribuciones de comunidades vegetales en el pasado (Cerling *et al.*, 1997; McFadden *et al.*, 1999a).

### **Objetivo:**

Este escrito busca describir los conceptos básicos, tanto teóricos como técnicos, necesarios para comprender los alcances y limitaciones del estudio de isótopos estables de carbono para la determinación de paleodietas. Para este propósito se explicará el por qué de la presencia de isótopos estables de carbono  $^{12}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  en tejidos animales, principalmente en el diente. De igual forma se describirá, de forma general, la técnica utilizada en el laboratorio para muestras fósiles. Para terminar se propondrá un estudio con faunas mexicanas, centrado en *Equus conversidens*.

## Marco Teórico.

### Plantas C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, CAM.

Las plantas pueden ser divididas en tres grupos de acuerdo a la ruta fotosintética o metabolismo: C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM.

Las plantas tipo C<sub>3</sub> forman un grupo que comprende el 85% de plantas a nivel mundial (McFadden, 2005), Encontrándose en todos los ecosistemas. Estas incluyen árboles, arbustos y diversas plantas herbáceas, coloquialmente denominadas como pastos. Estos últimos encontrados, principalmente, en climas templados o fríos (Feranec y McFadden, 2000).

Estas plantas están caracterizadas por poseer el esquema básico del Ciclo de Calvin, ciclo encargado de la fijación de carbono en todos los eucariontes fotosintéticos (Taiz y Zeiger, 2002). Al carecer de enzimas y moléculas adicionales que pueden observarse en los metabolismos C<sub>4</sub> y CAM, las plantas C<sub>3</sub> representan un estadio ancestral metabólico (Ehleringer *et al.*, 1997).

La denominación “C<sub>3</sub>” proviene de las características enzimáticas del Ciclo de Calvin. Este ciclo utiliza CO<sub>2</sub> y agua del medio ambiente junto con energía producida por las reacciones luminosas de la fotosíntesis para fijar átomos de carbono de la molécula de CO<sub>2</sub> y liberar el O<sub>2</sub> sobrante. El proceso se realiza a través de la captura de CO<sub>2</sub> por la enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa (rubisco) la cual, al realizar su actividad de carboxilasa, deriva en dos moléculas de tres carbonos llamadas 3-fosfoglicerato. Estas dos moléculas de tres carbonos son las responsables de la denominación C<sub>3</sub>, que hace alusión a “tres carbonos”(McFadden y Higgins, 2004).

No tan numerosas como las plantas C<sub>3</sub>, las plantas C<sub>4</sub> representan cerca de la mitad de las 10,000 especies de pastos (Ehleringer *et al.*, 1997). Su metabolismo es resultado de adaptaciones a climas cálidos donde la temperatura dificulta la fijación de carbono (Taiz y Zeiger, 2002). Gracias a estas adaptaciones, las plantas C<sub>4</sub> poseen mayor eficiencia para fijar moléculas de CO<sub>2</sub> en este tipo de climas (Epstein *et al.*, 1997).

Su denominación como plantas C<sub>4</sub> proviene de características anexas al Ciclo de Calvin. En este tipo de plantas encontramos como primera enzima receptora de CO<sub>2</sub> al fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) (Chollet *et al.*, 1996). Esta produce un ácido de cuatro carbonos (malato y/o aspartato) al entrar en contacto con el CO<sub>2</sub>. Este ácido es el que nombra a este metabolismo “C<sub>4</sub>” (McFadden y Higgins, 2004).

El grupo CAM (Metabolismo Acido de las Crasulaceas, en español), incluye a plantas de climas desérticos como “cactus”, “euforbias”, “pinas” y “agaváceas”, no restringiéndose únicamente a la familia Crassulaceae. Su metabolismo se caracteriza por la presencia de ácidos de cuatro carbonos como intermediarios en el proceso de fijación de carbono, así como sucede en las plantas C<sub>4</sub> (Taiz y Zeiger, 2002).

En los miembros de este tipo de plantas, el CO<sub>2</sub> es capturado en la noche por la enzima PEP carboxilasa en el citosol de la célula. El ácido, malato, se almacena en la vacuola. Durante el día, el ácido es transportado al cloroplasto, el CO<sub>2</sub> extraído y enviado a entrar al Ciclo de Calvin. Una característica importante de las plantas CAM es que su metabolismo puede cambiar a aquel presente en las plantas C<sub>3</sub> permitiendo que sea la enzima rubisco quien atrape en primer lugar la molécula de CO<sub>2</sub>. Se evita así el gasto energético de utilizar fosfoenolpiruvato carboxilasa y producir malato cuando no es necesario (Taiz y Zeiger, 2002).

### **Isótopos estables de carbono en plantas.**

Las plantas, independientemente de su metabolismo, obtienen el carbono necesario para formar tejidos y sustancias orgánicas del CO<sub>2</sub> disperso en la atmósfera. El CO<sub>2</sub> atmosférico, por su parte, se encuentra compuesto de los isótopos estables de carbono <sup>13</sup>C y <sup>12</sup>C en la proporción de 98.9% y 1.1% respectivamente (Boutton, 1991). Moléculas de CO<sub>2</sub> con uno u otro isótopo poseen las mismas características químicas y por lo tanto ambos tipos de moléculas son usadas por las plantas para obtener carbono. Este carbono es integrado a la planta por el Ciclo de Calvin (Taiz y Zeiger, 2002).

Debido a que aquellas moléculas de CO<sub>2</sub> formadas con carbono <sup>13</sup>C son ligeramente más grandes (2.3%, específicamente) que sus contrapartes, la mayoría de las plantas tienden a asimilar menos CO<sub>2</sub> con isótopo <sup>13</sup>C que aquellas compuestas de carbono <sup>12</sup>C (Taiz y Zeiger, 2002). Esto quiere decir que existe una selección por parte de las plantas en contra de moléculas de CO<sub>2</sub> formadas con isótopo más grande o pesado (Feranec y McFadden, 2000).

El grado de la selección de moléculas de CO<sub>2</sub> por parte de las plantas es diferente en cada tipo de metabolismo. Esta heterogeneidad se debe a la diferencia de enzimas utilizadas para fijar carbono: PEP carboxilasa en el caso de plantas C<sub>4</sub> y rubisco en plantas C<sub>3</sub> (plantas CAM pueden utilizar ambas enzimas). Ambas moléculas poseen una capacidad implícita en su diseño y funcionamiento para discriminar entre isótopos, siendo esta capacidad diferente para cada una (Taiz y Zeiger, 2002).

Rubisco posee una mayor discriminación en contra del isótopo <sup>13</sup>C comparada con la enzima PEP carboxilasa. De tal forma, observaremos una proporción isotópica con menor cantidad del isótopo <sup>13</sup>C en plantas C<sub>3</sub> que la que observaríamos en plantas C<sub>4</sub> (Taiz y Zeiger, 2002). Las plantas CAM por su parte, que pueden pasar de un metabolismo a otro dependiendo de las características ambientales, pueden mostrar proporciones isotópicas con valores intermedios a los observados en plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> (Boutton, 1991).

### **Isótopos estables de carbono en Animales.**

Los isótopos estables de carbono <sup>12</sup>C y <sup>13</sup>C tienen presencia en tejidos animales. Estos pueden encontrarse en todo tejido animal que utilice a este elemento como material de construcción. Entre ellos, los hueso, diente, pelo,

piel, fibras musculares e incluso CO<sub>2</sub> en el aliento son favorecidos estables debido a su resistencia o a su fácil acceso.

A diferencia de las plantas, los animales obtienen el carbono a partir de la dieta que consumen (McFadden *et al.*, 2004). Tejidos de individuos con hábitos alimenticios variados poseen una proporción isotópica distintiva de la mezcla de los diferentes alimentos. En contraste, en animales herbívoros, dada su usual especialización a cierto tipo de vegetación y dieta, poseen proporciones isotópicas que permiten identificar dietas basadas en plantas C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM (McFadden *et al.*, 2004).

### **Isótopos estables de carbono en el esmalte.**

El esmalte presente en los dientes es uno de los muchos tejidos animales en donde se pueden encontrar isotopos estables de carbono. Estos isotopos son agregados al esmalte en forma de carbonatos durante el proceso de formación del tejido.

La formación del esmalte se lleva a cabo durante un proceso denominado amelogénesis. Este consta de dos etapas. La primera, la etapa de secreción, es caracterizada por la formación de un tejido rico en proteínas y carente de componentes minerales. Este tejido es substituido en la etapa siguiente, la etapa de maduración, por la matriz mineral que compone al esmalte maduro (Passey y Cerling, 2005).

La matriz mineral que encontramos en el esmalte posee una mineralogía de hidroxiapatita, material responsable de la dureza del material. Este mineral es representado por la fórmula ideal de Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> y posee en su matriz carbonatos unidos a sus sitios fosfato e hidroxilo (Fox y Fisher, 2004). Este carbonato es el portador de isotopos en el esmalte.

Debido a su alta resistencia, los dientes pueden preservarse después de la muerte del animal e incluso resistir procesos de fosilización. El esmalte en si mismo permite conservar las proporciones isotópicas originales aun después de la diagénesis (Passey y Cerling, 2002).

### **Metodología para el análisis isotópico del esmalte fósil.**

Lee-Thorp y van der Merwe (1987) fueron los primeros autores en proponer el uso de dientes para el estudio de isotopos estables en animales y fósiles. Sus estudios aunados a los de Quade *et al.*, (1992) demostraron la resistencia que presenta el esmalte a procesos que podrían alterar sus proporciones isotópicas. De esta forma introdujeron el uso de los dientes a diversas disciplinas científicas como la paleontología. En la actualidad, el uso de los dientes para estudios isotópicos es bastante común debido a la resistencia del esmalte a la fosilización y a la abundancia de dientes fósiles de animales como el caballo.

Recientemente se han hecho innovaciones por autores como Cerling y Passey, para la correcta medición y lectura de los datos (Cerling y Harris, 1999; Passey y Cerling, 2002; Passey y Cerling, 2005), esto debido a que se conocen procesos inherentes a la formación del esmalte que pueden alterar las características isotópicas originales, especialmente en mamíferos de mediano y gran tamaño.

De igual forma, la técnica básica ha sido modificada y refinada por Kinga Revesz y Jurate Landwehr (2002), Tyler Coplen *et al.* (2006) y Fiona Brock *et al.* (2007).

La metodología que se presentara a continuación representa un esquema general de los pasos a seguir en el estudio de paleodietas a través del análisis de isotopos estables de carbono. Pretende ser de carácter ilustrativo, únicamente, por lo que omite procesos y materiales usados en análisis isotópicos. Un procedimiento más detallado para la medición de la proporción  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  puede encontrarse en Revesz, K. y Landwehr, J. (2002). Se recomienda observar las correcciones y refinamientos realizados a la metodología, propuesta por Revesz, descritos en Coplen, T. *et al.* (2006) y Fiona Brock *et al.* (2007).

### **Toma de muestras.**

Pueden tomarse dos tipos de muestras de piezas dentales fósiles: las muestras en lote, que son caracterizadas por ser una muestra por cada diente; y las muestras seriadas que se componen de diversas muestras de un solo diente (Feranec y McFadden, 2000).

Uno o los dos tipos de muestra pueden utilizarse en un mismo estudio con fin de aumentar el número de muestras, dependiendo del objetivo del trabajo. La cantidad de esmalte que compone cada muestra puede variar dependiendo del tamaño del ejemplar, pudiendo encontrarse en el orden de los 100 a 500 miligramos a gramos completos. Las muestras son obtenidas por medio de herramientas de rotación que infringen un desgaste mecánico.

### **Tratamiento de la muestra.**

El esmalte debe ser molido en un mortero de ágata hasta conseguir un polvo fino. Los compuestos orgánicos, unidos superficialmente a él, son eliminados. Una manera de hacerlo es a través del uso de una solución de 35% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (comúnmente conocido como agua oxigenada) o con  $\text{NaOCl}$ , durante una noche ( $\leq 24$  horas). Los carbonatos que pudieran haber sido agregados a la muestra por procesos de fosilización también deben ser eliminados. Esto se logra, usualmente, aplicando ácido acético 1.0 N a la muestra. Cabe destacar que esta debe limpiarse y enjuagarse con agua destilada antes de aplicar una nueva sustancia. Cuando la muestra queda libre de contaminación, debe de ser secada para después ser transformada en  $\text{CO}_2$ . Una forma de lograr el secado es con alcohol etílico al 95%, aplicándolo durante una noche. Para que la muestra seca puede ser convertida en  $\text{CO}_2$ , se expone a ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) al 100%, usualmente a  $90^\circ\text{C}$ , por 25 minutos (Feranec y McFadden,

2000). Finalmente, la medida de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  se realiza de acuerdo al procedimiento descrito por Kinga Revesz y Jurate Landwehr (2002) a 25°C utilizando el Gas Bench. Se pesan 0,6 mg de carbonato en tubos exentainer utilizando una microbalanza Mettler Toledo MX5 resolución de 0,000001g y son colocados en una plancha de aluminio a 25°C, cada tubo se le inyecta Helio 99.999% pureza durante 10 minutos para eliminar el aire utilizando una aguja de doble vía. Posteriormente se inyectan con una jeringa con llave 15 gotas de ácido ortofosfórico 100%. Todo esto con el objetivo de convertir los carbonatos de la muestra en  $\text{CO}_2$  mediante u reacción con ácido ortofosfórico al 100%, para determinar su composición isotópica de Carbono-13.

### **Descripción de la proporción isotópica de la muestra.**

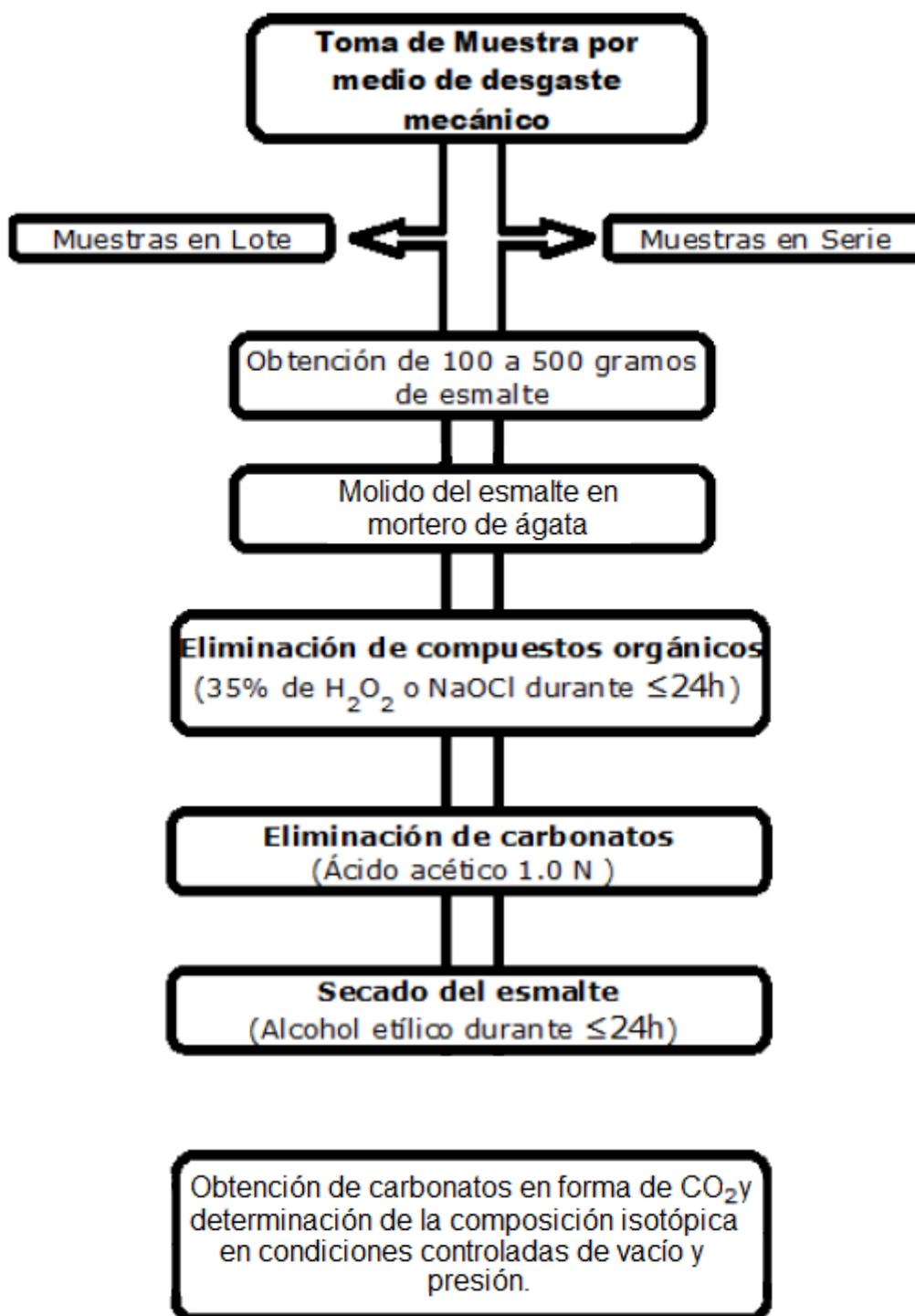
Obtenida la proporción isotópica de la muestra, esta debe ser comparada con un estándar y expresada con la notación diferencial delta respecto a él. Esta relación se expresa en la siguiente formula:

$$\delta^{13}\text{C} = \left[ \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{muestra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}} - 1 \right] \cdot 10^3$$

Donde  $\delta^{13}\text{C}$  es el cociente de los isótopos estables ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) de la muestra contra el patrón internacional VPDB.  $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{muestra}}$  y  $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}$  son las proporciones isotópicas de la muestra y el estándar, respectivamente. Multiplicar por mil permite mostrar los resultados en partes por mil (‰). El estándar con el cual la muestra es comparada es VPDB (Vienna Pee Dee belemnite) (Coplen, *et al.*, 2006).

Los valores obtenidos son comparados con aquellos conocidos para las plantas y sus diferentes metabolismos. Las plantas  $\text{C}_3$  poseen valores de  $\delta^{13}\text{C}$  alrededor de -27 partes por mil, plantas  $\text{C}_4$  alrededor de -13 partes por mil y plantas CAM valores en un rango intermedio a los dos anteriores (Boutton, 1991).

## DIAGRAMA DE FLUJO DE LA TOMA Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA



**Nota:** Todas las sustancias utilizadas deben ser, al menos, grado reactivo analítico.

## Limitaciones y consideraciones.

### Para la toma y tratamiento de muestra:

El estudio de las proporciones  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  demandan una cantidad de muestras que ronda las varias decenas, de manera que podamos minimizar el error estándar de la muestra (Newman, 1989).

La selección de piezas dentales puede estar influenciada por el tipo de animal que se estudie. Esto se debe a que en mamíferos es común la aparición de dientes en distinto orden, siendo algunos característicos de etapas infantiles o adultas. Dientes cuyo proceso de maduración se haya encontrado en una etapa infantil pueden llevar consigo proporciones isotópicas marcadas por los periodos de lactancia y crecimiento. Por ello es preferible el uso de piezas dentales originadas en la etapa adulta del individuo. De igual forma, se sugiere evitar el uso de 1ros y 2dos molares (McFadden *et al.*, 1999a).

### Para el cálculo de las proporciones isotópicas de las muestras:

Los resultados de  $\delta^{13}\text{C}$ , a demás de ser relativos al estándar VPDB, deben ser normalizados a través del uso de la escala VPDB que se encuentra delimitada por NBS 19 carbonato de calcio en su parte más positiva y por L-SVEC carbonato de litio en su parte más negativa (Coplen, *et al.*, 2006). Estos materiales, y otros que pueden usarse al normalizar los resultados de  $\delta^{13}\text{C}$ , se encuentran catalogados y establecidos por el NIST (National Institute of Standards and Technology).

En el caso específico de animales, es conocido que los valores isotópicos presentes en el esmalte se encuentran enriquecidos en isótopos  $^{13}\text{C}$  (Cerling y Harris, 1999). Este enriquecimiento se ve expresado por la siguiente fórmula:

$$\epsilon_{\text{esmalte-dieta}} = \left[ \left( \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{\text{esmalte}} \right) / \left( \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{\text{dieta}} \right) - 1 \right] \cdot 10^3$$

Donde  $\epsilon_{\text{esmalte-dieta}}$  es el factor de enriquecimiento de este material comparado con la dieta original. A su vez,  $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{dieta}}$  y  $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{esmalte}}$  son las proporciones  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  para la dieta y el esmalte, respectivamente.

Los valores para  $\epsilon_{\text{esmalte-dieta}}$  para mamíferos de mediano y gran tamaño (como son elefantes y caballos) es de 14.1 partes por mil (Cerling y Harris, 1999; McFadden y Higgins, 2004). En el caso de animales pequeños, como roedores, se ha observado que el factor de enriquecimiento para estos tejidos puede ser inexistente (Tieszen y Boutton, 1989). Estos valores deben ser restados a aquellos obtenidos de las muestras para obtener el valor final.

En el caso de estudios que pretenden observar cambios en los hábitos alimenticios de un animal durante un año o varios meses, debe tomarse en cuenta que la mineralización del esmalte no es homogénea si no que se

desarrolla en una dirección específica: de la corona a la raíz del diente (Passey y Cerling, 2002).

### **Para la interpretación de los resultados.**

Los metabolismos  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM, si bien son caracterizados por una proporción isotópica específica, no pueden ser relacionados con un tipo de planta únicamente. Aunque es común relacionar al metabolismo  $C_3$  con árboles y arbustos y al metabolismo  $C_4$  con pastos, este no siempre es el caso. De tal forma, la determinación de grupos más específicos de plantas como son “pastos” o “arbustos” necesita de conocimiento del contexto biogeográfico, geográfico y ecológico del área de donde provino la muestra analizada. Además de lo anterior, en estudios que pretenden usar dientes para el análisis isotópico, el conocimiento acerca de la morfología del mismo puede contribuir a una determinación más exacta de la dieta.

Con esto se busca indicar que, si bien el análisis isotópico en sí mismo puede otorgar entendimiento sobre antiguas dietas, estudios que buscan un análisis más profundo necesitan hacer uso de una gama de conocimientos mucho más amplia.

# HÁBITOS ALIMENTICIOS DE *Equus conversidens* POR MEDIO DEL ANÁLISIS DE ISÓTOPOS ESTABLES DE CARBONO $^{12}\text{C}$ Y $^{13}\text{C}$ .

## Introducción:

Desde inicios de la década de los noventa, el análisis de isótopos estables de carbono en dientes fósiles ha sido una herramienta utilizada para dilucidar hábitos alimenticios de animales extintos, especialmente de mamíferos herbívoros. Un grupo que ha sido ampliamente utilizado para este tipo de estudios ha sido el de los caballos. Esto se debe a que el género *Equus* posee un registro fósil abundante a lo largo del continente americano, permitiendo la realización de estudios para grandes áreas geográficas. Igualmente, esta ubicación hace posible adquirir las cantidades de muestras necesarias para el estudio de isótopos estables.

Entre los autores inmersos en el estudio del género *Equus*, Bruce McFadden ha sido pionero en el uso de estudios isotópicos en dientes de caballo. A través de estudios de esta naturaleza, este autor ha profundizado en los hábitos alimenticios de los caballos pleistocénicos e inferido implicaciones respecto a la evolución del grupo y a las características ambientales a las que estuvo sujeto en el pasado, de esta forma mostrando la gran utilidad que posee el análisis de isótopos estables en estudios paleontológicos.

La mayoría de los estudios de esta índole se han realizado en los Estados Unidos, con el registro fósil norteamericano. Poco se conoce sobre los hábitos alimenticios de caballos pleistocénicos de latitudes correspondientes a México o Sud América. Es de interés, entonces, el análisis isotópico de  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$  en las faunas de équidos pleistocénicos mexicanos. En este sentido, se propone un proyecto de análisis de isótopos estables, específicamente en el caballo pleistocénico *E. conversidens*.

## Caballos pleistocénicos mexicanos:

En México se reconocen tres grupos principales de équidos pleistocénicos: *Equus tau*, *Equus coversidens* y *Equus mexicanus*. Entre estos, *Equus conversidens* fue una especie de caballo de talla mediana que tuvo una gran distribución geográfica durante el Pleistoceno medio, encontrándose restos de esta especie en San Luis Potosí, Aguascalientes, Estado de México, Chiapas, Hidalgo, Nuevo León y Puebla (Melgarejo, 2007).

Basado en su aparente ausencia en los bosques de Norte América y en la presencia de un diente hipsodonto, se piensa que *E. conversidens* fue un animal nativo de amplias planicies y pastizales que se alimentaba de pasto (Dalquest, 1979; McFaden *et al.*, 1999b). Aún así, a través de estudios isotópicos se ha observado que a pesar de poseer dientes hipsodontos, los caballos pleistocénicos pudieron haber consumido una dieta variada y no “pasto” únicamente (McFaden *et al.*, 1999b).

## Objetivo:

Determinar si existe diferencia en la dieta de *Equus conversidens* en localidades mexicanas de diferente latitud.

## Material y Método:

Para este estudio se propone seleccionar tres localidades situadas en diferentes latitudes de la República Mexicana que representen en cierta medida el norte, centro y sur del país.

Las localidades idóneas por el número de piezas dentales de caballo ahí encontradas son: La Cueva de San Josecito, Nuevo León, para la región norte; El Cedazo, Aguascalientes, para la región centro; y Gliptodonte, Chiapas, para la región sur.

De estas tres localidades se buscará obtener cinco piezas dentales de *E. Conversidens* en buen estado y, preferiblemente, de individuos adultos. De estas piezas se tomarán siete muestras de esmalte a través de desgaste mecánico dando un total de treinta y cinco muestras por localidad y ciento cinco muestras en total para el estudio.

Las localidades de las cuales se obtendrán las piezas dentales poseen una edad rancholabreana, asegurando en la medida de lo posible que los individuos analizados sean contemporáneos entre ellos.

Las muestras obtenidas de las piezas dentales serán purificadas y analizadas por un espectrómetro de masas de acuerdo a los lineamientos generales descritos en este escrito. Los valores obtenidos serán expuestos en notación delta y sus características serán expuestas a través de estadística descriptiva. Para observar las diferencias entre las poblaciones de datos de una localidad con otra se utilizará un análisis de varianza o ANOVA.

## Hipótesis:

Estudios realizados por McFadden *et al.* (1999a) muestran que para el Pleistoceno la zona de transición entre pastos  $C_3$  y  $C_4$  se encontraba adentrada al norte de los Estados Unidos, al rededor de la latitud  $45^\circ N$ . Conforme la latitud desciende a partir de este punto hacia el ecuador, los valores isotópicos encontrados en fósiles reflejan la presencia cada vez más abundante de pastos  $C_4$ . A partir de las latitudes  $35^\circ N$  y  $30^\circ N$ , representativas de Texas, California y Nuevo México la ausencia de pastos  $C_3$  es prácticamente completa. De esta forma es de esperar que para todo el territorio mexicano, exceptuando zonas de gran altitud, se encuentre una predominancia de pastos  $C_4$  que continúa hasta el ecuador.

Tomando esto en cuenta, es de esperar que se encuentre una dieta basada en pastos  $C_4$  para los individuos de las tres localidades elegidas independientemente de su latitud dentro del Territorio Nacional. Por otra parte, la presencia de una dieta basada en plantas  $C_3$  podría indicar tanto un parche inusual de pastos  $C_3$  en el territorio mexicano o una dieta basada en hojas de arbustos o ramas bajas y no en pasto. Dada la aparente ausencia de pastos  $C_3$  en México, como sugiere McFadden, sería posible inclinarse por la segunda opción y pensar en una población de caballos que, a pesar de poseer un diente hipsodonto, poseyera hábitos ramoneadores.

Ambas opciones de interpretación de una dieta basada en plantas  $C_3$  poseen implicaciones muy interesantes. Por un lado el encontrar un parche de pastos  $C_3$  a pesar de la latitud, podría indicar una población de pastos inusualmente aislada o un ambiente inusualmente frío. Por otro lado, el suponer que se trata de una población de caballos que no se alimentan de pasto reforzaría la idea de McFadden *et al.* (1999b) de que los caballos pleistocénicos podrían haber tenido una dieta variada y no fundamentada únicamente en pastos.

## Referencias:

- Bender, M.M. (1968) **Mass spectrometric studies of carbon-13 variations in corn and other grasses.** Radiocarbon, 10: 468-472.
- Boutton, T.W. (1991) **Stable carbon isotope ratios of natural materials: I. Simple preparation and mass spectrometric análisis.** pp. 155–171. En Coleman, D.C., Fry, B. (editores) **Carbon Isotope Techniques.** Academic Press, Inc. San Diego, California. pp. 274.
- Brock, F., Ramsey, C. B. & Higham, T. (2007) **Quality assurance of ultrafiltered bone dating.** Radiocarbon, 49(2): 187-192.
- Cerling, T.E., Harris, J. M., Ambrose S. H., Leakey, M. G. & Solounias, N. (1997) **Dietary and environmental reconstruction with stable isotope analyses of herbivore tooth enamel from the Miocene locality of Fort Ternan, Kenya.** Journal of Human Evolution, 33: 635-650.
- Cerling, T.E. & Harris, J. M (1999) **Carbon isotope fractionation between diet and bioapatite in ungulate mammals and implications for ecological and paleoecological studies.** Oecologia, 120: 347-363.
- Chollet, R., Vidal, J. & O'Leary, M.H. (1996) **Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants.** Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47: 273-298.
- Coplen, T. B., Brand, W. A., Gehre, M., Groning, M., Meijer, H. A. J., Toman, B. & Verkouteren, R. M. (2006) **New guidelines for  $\delta^{13}\text{C}$  Measurements.** Analytical Chemistry, 78: 2439-2441.
- Craig, H. (1953) **The geochemistry of stable carbon isotopes.** Geochimica et Cosmochimica Acta, 3: 53-92.
- Craig, H. (1954) **Carbon-13 in plants and the relationship between carbon-13 and carbon-14 variations in nature.** Journal of Geology, 62: 115-149.
- Dalquest, W.W. (1979) **The little horses (Genus *Equus*) of the Pleistocene of North America.** American Midland Naturalist, 101(1): 241-244.
- DeNiro M. J. & Epstein S. (1978) **Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals.** Geochimica et Cosmochimica Acta, 42: 495-506.
- Ehleringer, J.R., Cerling, T.E. & Helliker, B.R. (1997) **C<sub>4</sub> photosynthesis, atmospheric CO<sub>2</sub> and climate.** Oecologia, 112: 285-299.
- Ehleringer, J.R. & Rundel, P.W. (1989) **Stable Isotopes: History, Units, and Instrumentation.** pp. 1-14. en: Ehleringer, J.R., Rundel, P.W. & Nagy, K.A (editors). **Stable Isotopes in Ecological Research.** Springer–Verlang. New York. pp. 525.
- Epstein, H.E., Lauenroth, W.K., Burke, I.C. & Coffin, D.P. (1997) **Productivity patterns of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> functional types in the U.S. Great Plains.** Ecology, 78: 722-731.
- Evans, R.D. (1982) **The Atomic Nucleus.** Krieger Publishing Company. Malabar, Florida. pp. 988.
- Feranec, R. S. & MacFadden B. J. (2000) **Evolution of the grazing niche in Pleistocene mammals from Florida: evidence from stable isotopes.** Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 162: 155–169.
- Fox, D.L. & Fisher, D.C. (2004) **Dietary reconstruction of Miocene Gomphoherium (Mammalia,**

**Proboscidea) from the Great Plains region, USA, based on the carbon isotope composition of tusk and molar enamel.** *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 206: 311-335.

- Haines, E.B. (1976) **Relationship between the stable carbon isotope composition of fiddler crabs, plants and soils in a salt marsh.** *Limnol. Oceanogr.* 21: 880-883.
- Lee-Thorp, J. & Merwe, N., J., van der. (1987) **Carbon isotope analysis of fossil bone apatite.** *South African Journal of Science*, 83: 712-715.
- McFadden, B.J., Cerling, T.E., Harris, J.M. & Prado, J. (1999a) **Ancient latitudinal gradients of C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> grasses interpreted from stable isotopes of New World Pleistocene horse (Equus) teeth.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31: 33-59.
- McFadden, B.J., Nikos S. & Cerling T.E. (1999b) **Ancient diets, ecology, and extinction of 5-million-year-old horses from florida.** *Science* 283: 824.
- McFadden, B.J. (2000) **Cenozoic Mammalian Herbivores from the Americas: reconstructing Ancient Diets and Terrestrial Communities.** *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31: 33-59.
- McFadden, B.J. & Higgins P. (2004) **Ancient ecology of 15-million-year-old browsing mammals within C<sub>3</sub> plant communities from Panama.** *Oecología* 140: 169-182.
- McFadden, B.J., Higgins P., Clementz M. T. & Jones D. S. (2004) **Diets, habitats preferences, and niche differentiation of Cenozoic sirenians from Florida: evidence from stable isotopes.** *Paleobiology* 30(2): 297-324.
- McFadden, B.J. (2005) **Diet and habitat of toxodont megaherbivores (Mammalia, Notoungulata) from the late Quaternary of South and Central America.** *Quaternary Research* 64: 113-124.
- Melgarejo Damian, María del Pilar (2007) **Diferenciación cuantitativa de especies de équidos del pleistoceno de México.** Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México. Facultad de Ciencias.
- Minson, D.J., Ludlow, M.M. & Troughton, J.H. (1975) **Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures.** *Nature*, 256: 602.
- Newman, J.G. (1989) **The Study of Diet and Trophic Relationships through Natural Abundance <sup>13</sup>C.** pp 201-219. En: en Coleman, D.C. & Fry, B. (editores) **Carbon Isotope Techniques.** Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Nier, A.O. & Gulbransen E.A. (1939) **Variations in the relative abundance of the carbon isotopes.** pp 4. En Ehleringer, J.R., Rundel, P.W. & Nagy, K.A.(1989) **Stable Isotopes in Ecological Research.** Springer-Verlang. New York. pp. 525.
- Park, R. & Epstein, S. (1960) **Carbon isotope fractionation during photosynthesis.** *Geochimica et Cosmochimica Acta* 21: 110-126.
- Passey, B. H. & Cerling, T. E. (2002) **Tooth enamel mineralization in ungulates: Implications for recovering a primary isotopic time-series.** *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(18): 3225-3234.
- Passey, B.H. & Cerling, T.E. (2005) **Inverse methods for estimating primary input signals from time-averaged isotope profiles.** *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(16): 4101-4116.

- Quade, J., Cerling, T.E., Barry, J.C., Morgan, M.E., Pilbeam, D.R., Chivas, A.R., Lee-Thorp, J.A. & Merwe, N.J., van der. (1992) **A 16-Ma record of paleodiet using carbon and oxygen isotopes in fossils teeth from Pakistan**. *Chemical Geology*, 94: 183–192.
  
- Révész, K. M. & Landwehr, J. M. (2002)  **$\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  isotopic composition of  $\text{CaCO}_3$  measured by continuous flow isotope ratio mass spectrometry: statistical evaluation and verification by application to Devils Hole core DH-11 calcite**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16: 2102-2114.
  
- Smith, B.N. & Epstein, S. (1971) **Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of higher plants**. *Plant Physiology*, 47: 380-384.
  
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002) **Plant Physiology**. 3ra Ed. Sinauer Associates inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. pp. 690.
  
- Tieszen L.L. & Boutton T.W. (1989) **Stable Carbon Isotopes in Terrestrial Ecosystem Research**. pp: 167-195. En: Ehleringer, J.R., Rundel, P.W. & Nagy, K.A (editores). **Stable Isotopes in Ecological Research**. Springer–Verlang. New York. pp. 525.