



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE RESIDUOS DE LÍPIDOS EN UN FOGÓN DE
3000 AÑOS DE ANTIGÜEDAD Y SU COMPARACIÓN CON
MUESTRAS ALIMENTICIAS

TESIS MANCOMUNADA

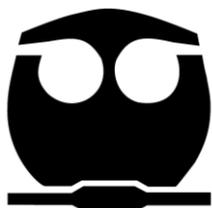
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICAS DE ALIMENTOS

PRESENTAN

NOEMÍ GABRIELA CASIO ARREOLA

Y

ANA MARÍA DE JESÚS LUNA ESTRADA



MÉXICO, D.F.

2014



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: M. en C. Lucía Cornejo Barrera
Vocal: Dra. Marisela Bernal González
Secretario: M. en C. Rolando Salvador García Gómez
1er Suplente: M. en A. I. Landy Irene Ramírez Burgos
2do Suplente: Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental. Conjunto E. Facultad de Química, UNAM con el uso de muestras proporcionadas por la Dra. Ann Cyphers del Instituto de Investigaciones Antropológicas

Asesor del
tema

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

Supervisor
Técnico

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Sustentantes

Noemí Gabriela Casio Arreola

Ana María de Jesús Luna Estrada

Índice

		Página
RESUMEN		1
CAPÍTULO 1	INTRODUCCIÓN	2
1.1.	Antecedentes	2
1.2.	Objetivos	3
1.2.1.	Objetivo general de la investigación	3
1.2.2.	Objetivos particulares	3
CAPÍTULO 2	FUNDAMENTACIÓN	5
2.1.	La cultura Olmeca: Localización y asentamientos más importantes	5
2.1.1.	San Lorenzo: Primera capital de la cultura olmeca	5
2.1.2.	La región de San Lorenzo: El entorno ambiental, fauna y flora de la zona	6
2.1.3.	Los islotes de la llanura norte de San Lorenzo	7
2.2.	Indicadores bioquímicos en recipientes orgánicos	9
2.3.	Análisis de lípidos en muestras arqueológicas	10
2.3.1.	Conservación del material lipídico en muestras arqueológicas	12
2.3.2.	Procesos de degradación y de contaminación	12
2.3.3.	Técnicas analíticas empleadas para la determinación de ácidos grasos en muestras arqueológicas	13
2.3.3.1.	<i>Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)</i>	13
2.3.3.2.	<i>Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CLAR-EM)</i>	16
2.3.3.3.	<i>Espectrometría de masas de relaciones isotópicas</i>	16
CAPÍTULO 3	METODOLOGÍA	18
3.1.	Origen de la muestra arqueológica	18
3.2.	Descripción detallada de la metodología del experimento piloto	20
3.3.	Descripción detallada de la metodología del experimento empleando la muestra arqueológica y las muestras de 2 especies típicas actuales de la zona de San Lorenzo, Veracruz: mojarra-tilapia y armadillo (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	30

		Página
CAPÍTULO 4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1.	Resultados de las muestras de pescado y ollas de barro el experimento piloto	35
4.2.	Resultados del experimento realizado con muestras del fragmento de fogón, pescado y armadillo	49
CAPÍTULO 5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
5.1.	Conclusiones	58
5.2.	Recomendaciones	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		60
ANEXOS		64
ANEXO A	Cromatogramas y espectros de masas de los compuestos identificados en las muestras de ollas de barro, pescado, armadillo y fragmento de fogón	64
ANEXO B	Diagramas ecológicos	97

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 3.1.	Ahumado artesanal	22
Tabla 3.2.	Cantidad de reactivos a emplear de acuerdo con la masa de la grasa extraída (Experimento piloto)	26
Tabla 3.3.	Programa de temperaturas establecidas en el equipo (CG-EM)	28
Tabla 4.1.	Masa de pescado y de las ollas de barro antes y después de ser sometidas al proceso de ahumado	36
Tabla 4.2.	Masa de pescado antes y después de liofilizar	37
Tabla 4.3.	Datos para realizar la extracción de las muestras de pescado liofilizadas y de las ollas de barro con y sin los residuos de pescado	39
Tabla 4.4.	Resumen de los compuestos determinados en las muestras de pescado fresco, pescado ahumado y ollas de barro con/sin la grasa de pescado mediante CG-EM	40
Tabla 4.5.	Datos para realizar la extracción de muestras de fogón, de carne de pescado y de armadillo, así como para posteriormente realizar su saponificación y derivatización	52
Tabla 4.6.	Resumen de los compuestos determinados en muestras de fogón, pescado fresco (<i>Oreochromis sp.</i>) y armadillo congelado (<i>Dasypus novemcinctus</i>) mediante CG-EM	55
Tabla 4.7.	Criterios para la identificación de restos arqueológicos en base a los patrones experimentales de descomposición de los residuos de cocción preparados en recipientes de cerámica. (Malainey, 2007)	57
Tabla A.1.	Tiempos de retención aproximados para cada compuesto identificado mediante CG-EM	78

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1. Mapa de la zona olmeca (Anónimo, 2012).	5
Figura 2.2. Plano de la región de San Lorenzo y llanuras (Cyphers y col, 2013)	6
Figura 2.3. Reconstrucción hipotética de un islote y <i>superestructura</i> con el fogón que se utilizó para ahumar pescado (Cyphers y col., 2013)	9
Figura 2.4. Ácidos grasos más comunes encontrados en fragmentos arqueológicos (Elaborada con la información de Cañabate y Sánchez, 1995)	12
Figura 2.5. Análisis por CG-EM (Modificado de Last y col., 2007)	15
Figura 2.6. Cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas cuadrupolar (ANALISYC, 2014)	15
Figura 3.1. Diagrama del proceso general seguido en el análisis de los ácidos grasos del fragmento de fogón	19
Figura 3.2. Diagrama de proceso para la determinación de los ácidos grasos de pescado y de las ollas de barro (experimento piloto)	20
Figura 3.3. Diagrama de proceso para la determinación de los ácidos grasos de pescado, armadillo y del fragmento de fogón	29
Figura 4.1. Esterificación de ácidos grasos con catálisis ácida	41
Figura 4.2. Trans-esterificación de lípidos por catálisis ácida	41
Figura 4.3. Esquema de fragmentación de las muestras mediante impacto electrónico (IE) dando como resultado el ión (M-3)+	43
Figura 4.4. Rearreglo de McLafferty resultando el ión de masa molecular 74	43
Figura 4.5. Cromatograma total de iones de la muestra 1 de pescado fresco, en donde cada uno de los números indicados del 1-10 representa un compuesto registrado en la Tabla 4.4	45
Figura 4.6. Cromatograma total de iones de muestra 2 de pescado ahumado, en donde cada uno de los números indicados del representa un compuesto registrado en la Tabla 4.4 y NI = No identificado	45
Figura 4.7. Cromatograma total de iones de la muestra 1 de la olla sin grasa (muestra control), en donde cada uno de los números indicados del representa un compuesto registrado en la Tabla 4.4	46
Figura 4.8. Cromatograma total de iones de la muestra 2 de la olla con grasa, en donde cada uno de los números indicados representa un compuesto registrado en la Tabla 4.4	46
Figura 4.9. Espectro de masas obtenido mediante IE (impacto electrónico) del éster metílico del ácido mirístico con un ión molecular de $m/z = 242$	46

	Página
Figura 4.10. Espectro de masas obtenido mediante IE (impacto electrónico) del éster metílico del ácido palmitoleico con un ión molecular de $m/z=268$	47
Figura 4.11. Espectro de masas obtenido mediante IE (impacto electrónico) del éster metílico del ácido palmítico con un ión molecular de $m/z=270$	47
Figura 4.12. Espectro de masas obtenido mediante IE (impacto electrónico) del éster metílico del ácido oleico con un ión molecular de $m/z=296$	47
Figura 4.13. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido palmítico (Espinoza, 2010)	48
Figura. A.1. Cromatograma total de iones de la muestra 1 del pescado fresco (Experimento piloto)	64
Figura. A.2. Cromatograma total de iones de la muestra 2 del pescado fresco (Experimento piloto)	65
Figura. A.3. Cromatograma total de iones de la muestra 1 del pescado ahumado (Experimento piloto)	66
Figura. A.4. Cromatograma total de iones de la muestra 2 del pescado ahumado (Experimento piloto)	67
Figura. A.5. Cromatograma total de iones de la muestra 1 de la olla sin grasa añadida (Experimento piloto)	68
Figura. A.6. Cromatograma total de iones de la muestra 2 de la olla sin grasa añadida (Experimento piloto)	69
Figura. A.7. Cromatograma total de iones de la muestra 1 de la olla con grasa añadida (Experimento piloto)	70
Figura. A.8. Cromatograma total de iones de la muestra 2 de la olla con grasa añadida (Experimento piloto)	71
Figura. A.9. Cromatograma de la muestra 1 de pescado	72
Figura. A.10. Cromatograma de la muestra 2 de pescado	72
Figura. A.11. Cromatograma de la muestra 1 de armadillo	73
Figura. A.12. Cromatograma de la muestra 2 de armadillo	73
Figura. A.13. Cromatograma de la muestra 1 del fragmento 1 de fogón	74
Figura. A.14. Cromatograma de la muestra 2 del fragmento 1 de fogón	74
Figura. A.15. Cromatograma de la muestra 1 del fragmento 2 de fogón	75
Figura A.16. Cromatograma de la muestra 2 del fragmento 2 de fogón	75
Figura A.17. Cromatograma de la muestra 1 del fragmento 3 de fogón	76
Figura A.18. Cromatograma de la muestra 2 del fragmento 3 de fogón	76
Figura A.19. Cromatograma de la muestra 1 del fragmento 4 de fogón	77
Figura A.20. Cromatograma de la muestra 2 del fragmento 4 de fogón	77
Figura A.21. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido dodecanoico, con un ión molecular de $m/z=214$	79
Figura A.22. Espectro de masas del éster metílico del ácido tridecanoico, con ión molecular $m/z=228$ (Christie, 2013)	79

	Página
Figura A.23. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido mirístico, con ión molecular $m/z = 242$	80
Figura A.24. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido pentadecanoico, con ión molecular $m/z = 256$	80
Figura A.25. Espectro de masas del éster metílico del ácido 12-metil-tetradecanoico, con un ión molecular de $m/z=256$ (Christie, 2013)	81
Figura A.26. Espectro de masas del éster metílico del ácido 7,10-metil-hexadecadienoico, con un ión molecular de $m/z=266$ (Christie, 2013)	81
Figura A.27. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido palmitoleico, con un ión molecular de $m/z=268$	82
Figura A.28. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido palmítico, con ión molecular $m/z = 270$	82
Figura A.29. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido heptadecanoico, con un ión molecular de $m/z=284$	83
Figura A.30. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido linolénico, con un ión molecular de $m/z=292$	83
Figura A.31. Espectro de masas del éster metílico del ácido 9,12 octadecadienoico (ácido linoleico) con un ión molecular de $m/z=294$ (Christie, 2013)	84
Figura A.32. Espectro de masas del éster metílico del ácido 9-octadecenoico (ácido oleico), con un ión molecular de $m/z=296$ (Christie, 2013)	84
Figura A.33. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 10-octadecenoico (isómero del ácido oleico), con un ión molecular de $m/z=296$	85
Figura A.34. Espectro de masas del éster metílico del ácido 11-octadecenoico (isómero del ácido oleico), con un ión molecular de $m/z=296$ (Christie, 2013)	85
Figura A.35. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido esteárico, con un ión molecular de $m/z=298$	86
Figura A.36. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido ciclopropanopentanoico, 2-undecilo, con un ión molecular de $m/z=310$	86
Figura A.37. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido nonadecanoico (19:00), con un ión molecular de $m/z=312$	87
Figura A.38. Espectro de masas del éster metílico del ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, con un ión molecular de $m/z=316$ (Christie, 2013)	87

	Página
Figura A.39. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido araquidónico, con un ión molecular de $m/z=318$	88
Figura A.40. Espectro de masas del éster metílico del ácido 11,14,17-eicosatrienoico, con un ión molecular de $m/z=320$ (Christie, 2013)	88
Figura A.41. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido eicosadienoico, con un ión molecular de $m/z=322$	89
Figura A.42. Espectro de masas del éster metílico del ácido 5-eicosenoico, con un ión molecular de $m/z=324$ (Christie, 2013)	89
Figura A.43. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 11-eicosaenoico, con un ión molecular de $m/z=324$	90
Figura A.44. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido eicosanoico, con un ión molecular de $m/z=326$ (Christie, 2013)	90
Figura A.45. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido docosahexenoico, con un ión molecular de $m/z= 342$	91
Figura A.46. Espectro de masas del éster metílico del ácido 13-docosenoico , con un ión molecular de $m/z=352$ (Christie, 2013)	91
Figura A.47. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 20-metil-heneicosanoico (iso), con un ión molecular de $m/z= 354$	92
Figura A.48. Espectro de masas del éster metílico del ácido docosanoico, con un ión molecular de $m/z= 354$ (Christie, 2013)	92
Figura A.49. Espectro de masas del éster metílico del ácido tricosenoico, con un ión molecular de $m/z=368$ (Christie, 2013)	93
Figura A.50. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido tetracosanoico, con un ión molecular de $m/z=382$	93
Figura A.51. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del colesterol, con un ión molecular de $m/z=386$	94
Figura A.52. Espectro de masas del éster metílico del ácido pentadecanoico, con un ión molecular de $m/z=396$ (Christie, 2013)	94
Figura A.53. Espectro de masas del éster metílico del ácido hexacosanoico, con un ión molecular de $m/z=410$ (Christie, 2013)	95
Figura A.54. Espectro de masas por <i>EI</i> (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido octacosanoico, con ión molecular de $m/z = 438$	95
Figura A.55. Espectro del éster metílico del ácido tricontanoico, con un ión molecular de $m/z=466$ (Christie, 2013)	96

ÍNDICE FOTOGRÁFICO

	Página
Imagen 2.1. Vista de los elementos quemados (fogones) en un islote de la llanura norte (Cyphers y col., 2013)	8
Imagen 3.1. Fragmento de fogón con aproximadamente 3000 años de antigüedad	18
Imagen 3.2. Ahumador que consta de a) olla de acero inoxidable, b) tapa de acero inoxidable, c) rejilla de metal de aprox. 20 cm de diámetro, d) dos ollas de barro sin barnizar, e) alambre galvanizado de calibre #16, f) aserrín de encino y g) parrilla eléctrica de calentamiento	22
Imagen 4.1. Muestras de filete de pescado antes de ahumar	35
Imagen 4.2. Muestras de filete de pescado después del proceso de ahumado	36
Imagen 4.3. Ollas de barro. Lado izquierdo olla 1 (1). Lado derecho, olla 2 (2). En la parte superior (1 y 2), ahumado de mojarra-tilapia en ollas de barro. En la parte central (3 y 4), ollas con los residuos de pescado (lípidos y otros compuestos). En la parte inferior (5 y 6) muestras pulverizadas	36
Imagen 4.4. Muestras de filete de pescado antes y después del proceso de liofilización, respectivamente	37
Imagen 4.5. Liofilizadora marca Labconco, modelo Free Zone 4.5	37
Imagen 4.6. Extracción Soxhlet empleando éter de petróleo, p.e. 30-60°C, de muestras de mojarra-tilapia	38
Imagen 4.7. Material montado para realizar la derivatización de los ácidos grasos de mojarra-tilapia	38
Imagen 4.8. Carne de armadillo, en el que puede apreciarse parte de un hueso y un órgano	49
Imagen 4.9. Carne de armadillo, en la que puede apreciarse el caparazón que se le retiró	49
Imagen 4.10. Carne de armadillo y carne de pescado, antes del proceso de secado	50
Imagen 4.11. Carne de armadillo y carne de pescado, después del proceso de secado	50
Imagen 4.12. Vista de las cuatro diferentes partes del fragmento de fogón que se eligieron para ser analizadas	51
Imagen 4.13. Muestras molidas de las partes del fragmento de fogón	51

RESUMEN

La presente investigación se enfoca a estudiar el contenido de ácidos grasos de un fragmento arqueológico (fogón) de la cultura olmeca proveniente de la región de San Lorenzo-Tenochtitlán, Veracruz. En la literatura se ha confirmado que los lípidos son los residuos orgánicos que más se han estudiado debido a su presencia en diferentes alimentos y que gracias a sus características químicas son de gran utilidad para la identificación de posibles contenidos de recipientes antiguos. La parte experimental del presente estudio se enfocó primero, en establecer una metodología para la extracción y análisis de lípidos en muestras biológicas y arqueológicas. La metodología se basó principalmente en las normas NMX-F-089-S-1978 para la extracción de los lípidos por medio del método de Soxhlet) y NMX-F-017-SCFI-2011 para el análisis de ácidos grasos por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). La extracción se realizó durante 5 h usando como disolvente éter de petróleo (p.e.¹, 30 a 60°C) para las carnes de pescado fresco (*Oreochromis sp.*) y armadillo congelado (*Dasypus novemcinctus*) y durante 3 h con cloroformo-metanol 2:1 para las muestras del fragmento de fogón. La grasa extraída fue sometida a una saponificación usando NaOH en metanol, con el fin de separar los ácidos grasos de los triacilglicerol. Para analizar los ácidos grasos por medio de cromatografía de gases fue necesario transformar los ácidos grasos en sus correspondientes ésteres metílicos para conseguir compuestos con una mayor volatilidad. Esta transformación o “derivatización”, como se le conoce en la jerga analítica, se llevó a cabo empleando HCl en metanol. Para la identificación de los ésteres metílicos se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas con el cual fue posible la identificación en común, en las muestras del fogón, pescado y armadillo, de los ácidos grasos siguientes: mirístico, pentadecanoico, palmitoleico, palmítico, margárico, oleico, isómeros del ácido oleico, esteárico, araquídico y behénico. El ácido palmítico y el ácido oleico, así como algunos de los isómeros de este último fueron los ácidos grasos presentes en mayor porcentaje. El fogón contenía ácidos grasos en su mayoría de origen vegetal que probablemente provenían de la palma que los olmecas empleaban como combustible. Así mismo, se identificaron ácidos grasos de origen animal, por lo que se puede decir que en él, probablemente se preparaban alimentos de origen animal y en este caso, en particular, alimentos como el pescado. Será interesante seguir estudiando las muestras de otros fragmentos del fogón con el objetivo de verificar un mayor porcentaje de ácidos grasos de origen animal.

Palabras clave: Ácidos grasos, fogón, cultura olmeca, CG-EM, mojarra-tilapia (*Oreochromis sp.*), armadillo (*Dasypus novemcinctus*)

¹ p.e., punto de ebullición

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

San Lorenzo-Tenochtitlán, Veracruz, México, fue la primera capital de la cultura olmeca. Al igual que muchas capitales antiguas y actuales del mundo, dominó un punto estratégico, lo que le permitió controlar la comunicación y el transporte terrestre y acuático. Esta región fue fuente de abundantes recursos alimenticios para su creciente población y en ella se realizaban actividades como la pesca, la caza, la recolección y la agricultura de inundación o recesión. Se sabe que dentro de las principales actividades de esta cultura prevaleció la pesca y se piensa que la principal forma de conservación que tenían era el ahumado de sus alimentos.

Como parte del Proyecto Arqueológico San Lorenzo-Tenochtitlán (PASLT) del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM se han llevado excavaciones en la región, donde se han encontrado restos de diferentes fogones² en los cuales se ha preservado materia orgánica (Cyphers y col., 2013).

El análisis de residuos orgánicos en restos arqueológicos tiene la capacidad de proporcionar información de interés para la investigación arqueológica. A través de dicho análisis y junto con otros datos arqueológicos, se puede llegar a establecer el tipo de contenido y una aproximación a la dieta que tenían las culturas antiguas. Dentro de los residuos orgánicos los más extensamente estudiados son los lípidos que, por su presencia en diversos alimentos y características químicas, son de gran interés para la identificación de posibles contenidos de recipientes, ya que al absorberse por los poros de las matrices se da una micro encapsulación que inhibe la actividad bacteriana, por lo que se cree que las adherencias de lípidos en los recipientes representan las primeras utilidades de los mismos (Cañabate y Sánchez, 1995; Passi y col., 1981).

Dado el contexto anterior, en esta investigación se analizaron los residuos de lípidos de un fragmento de un fogón hallado en la región norte de San Lorenzo, el cual data del año 900 a.C., con la finalidad de conocer el tipo de alimentación de

² Fogón (Del lat. focus, fogón). Sitio adecuado en las cocinas para hacer fuego y guisar (RAE, 2014)

los habitantes de esta región, la cual debió estar constituida por recursos accesibles en la zona, entre los cuales destacan por citar algunos de ellos, pescados, tortugas, iguanas, venados y armadillos. Dicho fragmento ha sido proporcionado por personal del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM, por lo que la importancia de este estudio no se limita al conocimiento de la posible alimentación de esta cultura, sino que servirá de base para un análisis más completo desde el punto de vista arqueológico y así comprender mejor a esta enigmática cultura.

En lo que respecta a la parte experimental, este estudio se enfocó a realizar una extracción de los residuos de lípidos por medio del método de Soxhlet con modificaciones a la NMX-F-089-S-1978, (DOF, 1978) para posteriormente encontrar una metodología de determinación de ácidos grasos empleando reactivos menos dañinos con el ambiente que los establecidos en la NMX-F-017-SCFI-2011 (DOF, 2011).

A continuación se expondrán los objetivos particulares de la investigación en el marco de un objetivo general.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general de la investigación

Determinar el contenido de ácidos grasos (a partir de sus ésteres metílicos) de un fragmento de fogón olmeca para que se obtengan datos que sirvan de base arqueológica para la identificación de los principales alimentos que la población consumía.

1.1.2. Objetivos particulares

- Establecer una metodología de determinación de ácidos grasos para materiales biológicos (muestras de pescado) y muestras arqueológicas a analizar con modificaciones a las normas mexicanas NMX-F-089-S-1978 y NMX-F-017-SCFI-2011 para utilizar reactivos menos dañinos con el ambiente.

- Extraer ácidos grasos de los restos de un fogón de aproximadamente 3000 años de antigüedad para su posterior caracterización por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas.
- Comparar los resultados obtenidos del análisis de los ácidos grasos del fogón con el análisis del contenido de lípidos de 2 especies típicas actuales de la zona: mojarra-tilapia (*Oreochromis sp.*) y armadillo (*Dasypus novemcinctus*).
- Comparar los resultados obtenidos en el análisis de los ácidos grasos contenidos en el fogón con los criterios de identificación de residuos de alimentos en fragmentos arqueológicos citados en la literatura.

CAPÍTULO 2 FUNDAMENTACIÓN

2.1. La cultura Olmeca: Localización y asentamientos más importantes

Se considera a la cultura olmeca como la que se desarrolló en el área ubicada al sur de los actuales estados de Veracruz y frontera norte de Tabasco, en la costa del Golfo de México (Casellas, 2004; Maza 2006). El término náhuatl "olmeca" significa "habitantes del país del hule". Los más importantes asentamientos de la cultura olmeca descubiertos hasta este momento son San Lorenzo Tenochtitlán, La Venta, Tres Zapotes y Laguna de Cerros en México. La ubicación de los mismos se muestra en la Figura 2.1 (Carrasco, 2004).



Figura 2.1. Mapa de la zona olmeca (Anónimo, 2012)

2.1.1. San Lorenzo: Primera capital de la cultura olmeca

Las indagaciones dedicadas a conocer la evolución de los olmecas registran un largo proceso marcado por asentamientos primarios que los arqueólogos sitúan hacia 1800 a 1600 a.C. en San Lorenzo, una meseta rodeada por los ríos Chiquito

y Coatzacoalcos, cerca de la costa sur de Veracruz. Logró su máximo esplendor entre el 1400 y 1000 a.C. San Lorenzo fue la cabecera de aldeas dispersas. (Cyphers y col., 2013; Florescano, 2007).

2.1.2. La región de San Lorenzo: El entorno ambiental, fauna y flora de la zona

La región de San Lorenzo se localiza en una región de llanura (Figura 2.2) que tiene zonas con tendencia a las inundaciones, es por ello que las aldeas estaban ubicadas en terreno alto por arriba del nivel de inundación, a manera de un archipiélago dentro de los humedales, comúnmente separados de sus vecinos por amplias extensiones de agua y terrenos pantanosos que los aislaban, especialmente durante la temporada de lluvias cuando el nivel del agua se elevaba. En particular la región norte se destacaba por presentar una abundancia de cursos fluviales ramificados y una mayor captura de agua (Cyphers y col., 2013).

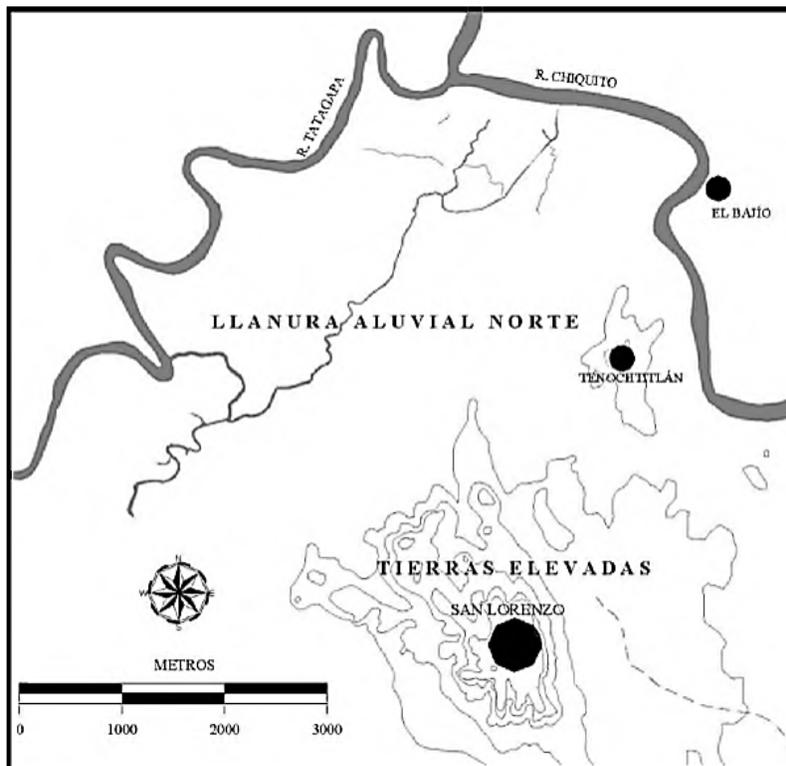


Figura 2.2 Plano de la región de San Lorenzo y llanuras (Cyphers y col., 2013)

De acuerdo con los datos arqueológicos, en el sistema fluvial debían encontrarse peces, siendo el más común la mojarra, además de algunas clases de crustáceos, mariscos y moluscos. Entre otras especies de importancia, se encuentran las aves como el águila arpía además de iguanas, caimanes, tortugas, sapos, venados, osos hormigueros, armadillos, mapaches, coyotes, zorros, monos aulladores, monos araña, jaguares, ocelotes y serpientes, solamente por citar a algunos (Casellas, 2004).

Ya desde tiempos de la cultura olmeca las plagas de insectos pudieron intervenir en las cosechas, además pudieron encontrarse otras especies consideradas peligrosas como son la araña capulina, la viuda negra, escorpiones, pulgas, garrapatas y murciélagos. Mención especial deben tener las abejas que, además de peligrosas por sus picaduras, son las productoras desde tiempos antiguos de miel y cera para la subsistencia de estas poblaciones (Casellas, 2004).

De acuerdo con Florescano (2007) los olmecas cultivaron alimentos necesarios para la sobrevivencia de los grupos humanos como son el maíz, la calabaza, el frijol, el chile y diversos tipos de legumbres; sin embargo, las investigaciones de Cyphers y col. (2013) indican que el cultivo en esta zona representaba un riesgo debido a las temporadas de inundación de la zona. Es por ello que una forma efectiva de obtener alimentos pudo ser la pesca y la caza de tortugas y otros animales.

2.1.3. Los islotes de la llanura norte de San Lorenzo

Al estudiar las llanuras de inundación se encontraron estructuras artificiales que se denominaron con el nombre de islotes. Los islotes consisten en la edificación de un montículo bajo, realizado con tierra, como base de una estructura adicional (las cuales se denominan con el nombre de *superestructuras*). Se trata de una arquitectura especial diseñada para la explotación de los recursos de la zona. Podría tratarse de ocupaciones estacionales de colecta de fauna acuática atrapadas en la recesión de las aguas de la inundación. La mayor densidad de islotes se localiza en una zona de humedales al norte de San Lorenzo, lo cual

indica su potencial único para la subsistencia, que la hizo particularmente atractiva para los primeros olmecas. En diferentes centros de los islotes estudiados se encontraron elementos quemados (fogones) que varían de 50 a 190 cm de largo con un ancho entre 30 y 60 cm, la profundidad interior tiene un promedio de 30 cm y las paredes de 3 a 8 cm de grosor (Imagen 2.1).



Imagen 2.1. Vista de los elementos quemados (fogones) en un islote de la llanura norte (Cyphers y col., 2013).

Estos elementos sugieren que la porción central y más segura de las *superestructuras* se haya utilizado para la preparación y preservación de alimentos, incluyendo el secado y el ahumado. Uno de los productos que pudo ser secado y ahumado es el pescado ya que puede conservarse, dependiendo del tamaño, de 1 a 5 meses (Cyphers y col., 2013). En la Figura 2.3 puede observarse una representación hipotética de cómo se pudo haber ahumado en un fogón dentro del islote.

Cabe mencionar que la muestra analizada en esta investigación, provino de uno de los islotes de la llanura norte.

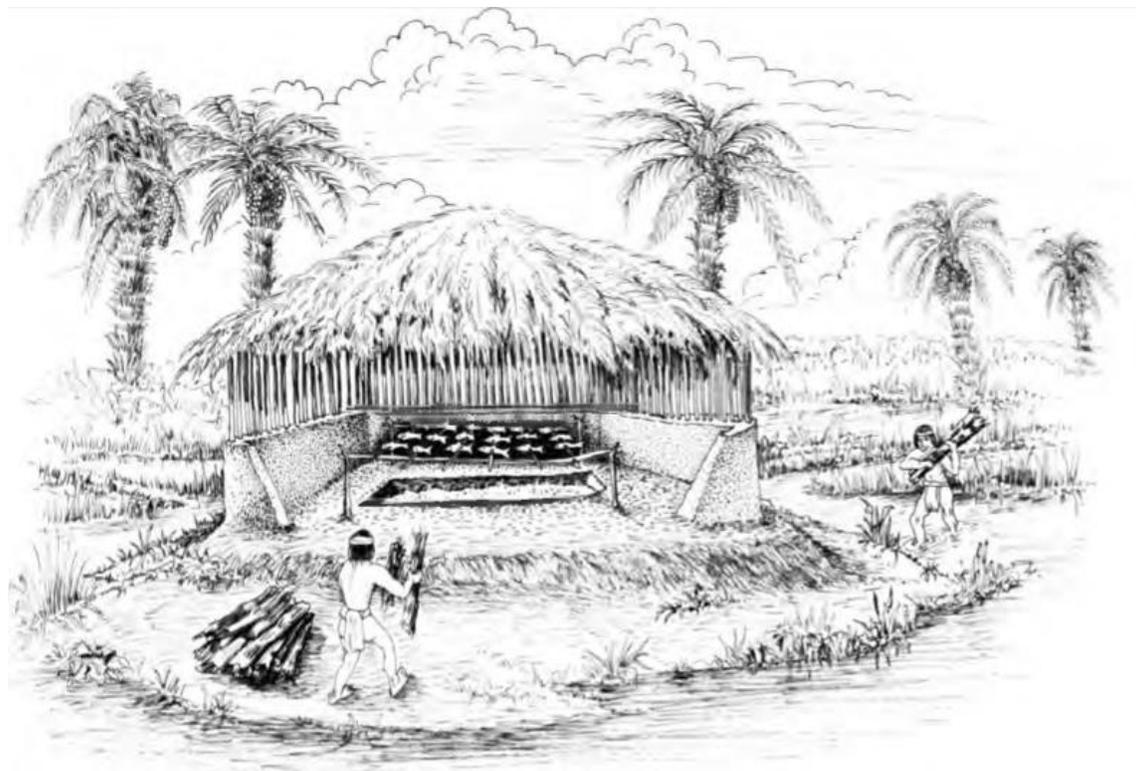


Figura 2.3. Reconstrucción hipotética de un islote y *superestructura* con el fogón que se utilizó para ahumar pescado (Cyphers y col., 2013).

2.2. Indicadores bioquímicos en recipientes orgánicos

El análisis de indicadores bioquímicos de contenidos en recipientes arqueológicos debería ser entendido como una línea más de investigación dentro de los estudios de caracterización de artefactos prehispánicos. Incluir este tipo de análisis permitiría lograr un acercamiento más exacto al posible contenido y función de los recipientes. De esta manera pueden abrirse nuevas vías de estudio en el campo de las dietas o, bien, en la reconstrucción de los patrones de actividad pasados para la definición de *áreas de actividad*³ (Cañabate y Sánchez, 1995; Passi y col., 1981).

Los residuos orgánicos incluyen una amplia variedad de sustancias. Ellos representan los restos basados en carbono (en combinación con H, N, O, P y S) de hongos, plantas, animales y seres humanos. Dichos residuos se han extraído y

³ Un *área de actividad* es un área espacialmente restringida donde se ha realizado una tarea específica o conjunto de tareas relacionadas, y se caracteriza generalmente por una acumulación de herramientas, productos de desecho y/o materias primas (Williams, 1994)

estudiado a partir de diversos materiales arqueológicos. Derivados de ellos, se han aislado lípidos, proteínas, almidones, ADN y lignina entre otros. Comúnmente, los residuos estudiados incluyen proteínas de la sangre de las superficies de las herramientas de piedra, ácidos grasos absorbidos en las paredes de las ollas y adhesivos a base de resina (Eerkens y Barnard, 2007).

Los residuos orgánicos sobreviven asociados a los recipientes arqueológicos principalmente en tres formas:

- 1) Como contenido en vasijas selladas
- 2) Como restos en la superficie, ya sea interna o externa
- 3) Dentro de los poros de las paredes del recipiente, absorbidos por éstas.

2.3. Análisis de lípidos en muestras arqueológicas

Los análisis de residuos orgánicos se han realizado sobre la base de su capacidad para resistir la descomposición en diferentes ambientes de depósito, así como los requisitos de los métodos analíticos. Por lo tanto, los lípidos que se preservan en los recipientes arqueológicos se encuentran relativamente bien estudiados debido a que tienden a sobrevivir arqueológicamente y a su fácil manejo en el laboratorio (Eerkens y Barnard, 2007, Mirón, 2002).

Los ácidos grasos presentan características únicas que los convierten en buenos indicadores bioarqueológicos ya que, por un lado, existen en diferentes combinaciones y en proporciones similares para cada especie de planta y animal y, por el otro, pueden sobrevivir largos periodos. Su preservación en los residuos de superficies carbonizadas es excelente, debido a la microencapsulación que inhibe la actividad bacteriana y, por ende, en los poros de las paredes de las vasijas, por lo que de esta forma no son contaminados con materia orgánica del suelo. Por ello se cree generalmente que las adherencias representan las primeras utilidades de la vasija, por lo que la identificación de estos residuos puede proveer a los arqueólogos de información acerca de la utilidad de las vasijas e ir más allá en la comprensión de las prácticas culinarias, las estrategias de subsistencia que tenían y el tipo de dieta que llevaban. Los trabajos experimentales demuestran que los triglicéridos (principal componente de la

grasa) después de 100 días de degradación bajo condiciones oxidantes virtualmente desaparecen dando origen a los ácidos grasos. El origen de los lípidos puede ser fácilmente distinguido a través de la identificación de los esteroides (Cordero, 2011).

Han sido pocos los estudios sobre los residuos lipídicos que se han llevado a cabo en la región de Mesoamérica, como lo son la identificación de semillas de cacao en una vasija ceremonial y el análisis de lípidos de residuos de maíz en cerámica (Mirón, 2002).

Aunque la definición de lípido puede cambiar de un autor a otro, se puede decir que los lípidos son un grupo de sustancias heterogéneas que engloban ácidos grasos carboxílicos, esteroides, acilglicérols, etc., que tienen como características principales el ser insolubles en agua, lo que favorece su permanencia en el lugar donde fueron depositados, y ser solubles en disolventes orgánicos como éter, cloroformo, etc. (Cañabate y Sánchez, 1995; O'Keefe, 2002).

Los lípidos de mayor interés en el campo de la investigación arqueológica son:

- **Ácidos grasos.**- La mayoría son ácidos grasos monocarboxílicos de cadena lineal, distinguiéndose unos de otros en la longitud de la cadena y en el grado de insaturación, es decir, en la presencia y número de dobles enlaces. Los ácidos grasos más comúnmente encontrados en los fragmentos arqueológicos son los que se muestran en la Figura 2.4.
- **Acilglicérols.**- Son componentes abundantes de grasas y aceites, tanto de origen vegetal como de origen animal, formándose por una reacción de esterificación entre el glicérol y los ácidos grasos
- **Esteroides.**- Son alcoholes de alta masa molecular presentes minoritariamente en la fracción insaponificable de las grasas. El colesterol es el esteroide más abundante en los animales; por el contrario, el campesterol y el sitosterol, son los esteroides más abundantes en las plantas. La detección de algún esteroide puede orientar acerca del tipo de grasa asociada con el contenido del fragmento; sin embargo, resulta relativamente difícil dada la baja proporción en la que se encuentran.

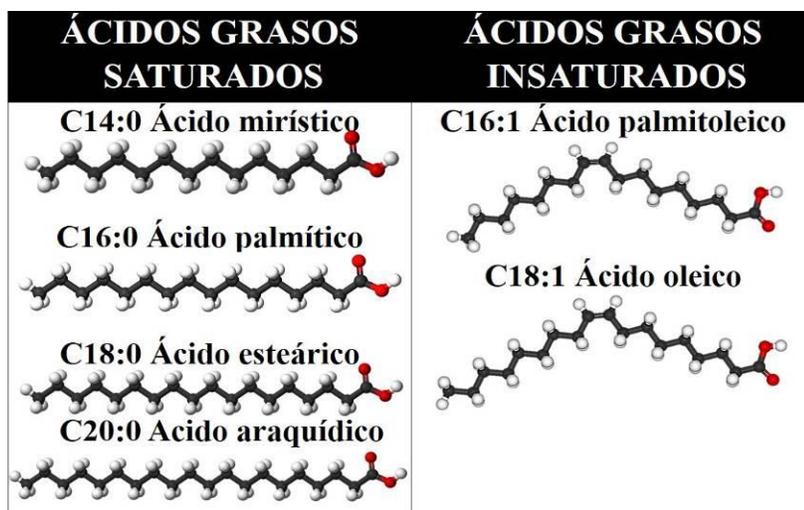


Figura 2.4. Ácidos grasos más comunes encontrados en fragmentos arqueológicos (Elaborada con la información de Cañabate y Sánchez, 1995)

2.3.1. Conservación del material lipídico en muestras arqueológicas

El grado de conservación de los lípidos puede depender de las condiciones de enterramiento, del material lipídico y de la carbonización, que es cuando los tejidos orgánicos se carbonizan a baja temperatura y se lleva a cabo la formación de una especie de vesículas en las que el material lipídico permanece intacto.

2.3.2. Procesos de degradación y de contaminación

Los lípidos presentan algunas características que favorecen su elección como indicadores bioquímicos. No obstante, hay que considerar los siguientes factores:

- **Cambios químicos producidos por procesos de degradación en la materia orgánica.** Los principales procesos de degradación son los siguientes:
- **Hidrólisis.-** Este proceso es provocado por la humedad, temperatura, enzimas y diversos microorganismos que producen la ruptura del enlace éster, dando lugar a la liberación de los ácidos grasos que forman parte de los acilgliceroles.
- **Oxidación.-** Ciertos grupos funcionales presentes en los lípidos son particularmente sensibles a la oxidación. Entre estos grupos se encuentran principalmente los dobles enlaces y, en consecuencia, los ácidos grasos

insaturados sufrirán en mayor extensión este proceso. De ahí que resulte difícil encontrar ácidos grasos con un número de insaturaciones superior a una.

- **Degradación microbiológica.**- La materia orgánica enterrada, a menos que esté protegida de alguna forma, puede sufrir procesos degradativos por microorganismos activos en la matriz de enterramiento.
- **Contaminación lipídica post-excavación.**- Proviene de los lípidos de la piel introducidos a través de la manipulación de los artefactos
- **Reutilización del recipiente.**- Ésta es una posibilidad que debe considerarse y que es difícil de detectar. No obstante, la presencia simultánea de compuestos exclusivos de ciertas especies animales o vegetales podría indicar la reutilización del recipiente. (Cañabate y Sánchez, 1995).

2.3.3. Técnicas analíticas empleadas para la determinación de ácidos grasos en muestras arqueológicas

2.3.3.1. Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)

La determinación del origen de la materia orgánica en recipientes antiguos mediante cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM, por sus siglas en español o *GC-MS*, por sus siglas en inglés) es una herramienta que se utiliza desde hace relativamente poco tiempo. Es un método efectivo y eficiente para analizar muestras de tipo orgánico. Esta técnica se ha utilizado para determinar la composición de ácidos grasos de los residuos arqueológicos (Malainey, 2007).

La cromatografía de gases es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra en dos fases. Una fase es el lecho estacionario de extensa superficie empacada apretadamente dentro de una columna. Ésta es la fase estacionaria y puede ser un sólido o una delgada película líquida que recubre al sólido. La otra fase es conocida como la fase móvil, la cual consiste en un gas portador inerte que eluye los componentes de una mezcla a través de la columna sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma. Su separación se basa en las

diferencias en los puntos de ebullición y la temperatura de la columna (López 2008; Skoog y col., 2001). La cromatografía de gases es la principal técnica analítica para la separación de compuestos volátiles y semivolátiles, por su rápido análisis, fácil resolución, operación y excelentes resultados cuantitativos. Para poder confirmar la identidad o estructura de cada compuesto las mejores técnicas de análisis cualitativo son aquellas que combinan la capacidad de separación de la cromatografía con la capacidad de la identificación de los compuestos, como la espectroscopía de masas (técnicas acopladas) (Gutiérrez y Droguet, 2002; López, 2008). Por otro lado, un espectrómetro de masas es capaz de proporcionar información acerca de: la composición elemental de las muestras; la estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas y de las relaciones isotópicas de átomos en las muestras (López, 2008). Para analizar las muestras en el espectrómetro de masas, las muestras se ionizan, formando moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+); además, también se forman fragmentos de iones debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. La masa y abundancia relativa de estos iones se muestra en el espectro de masas, el cual es diferente para cada compuesto químico y constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado (Gutiérrez y Droguet, 2002; López, 2008). Estudios realizados en la década de los 50 del Siglo XX empleando espectrometría de masas de ésteres de ácidos grasos fueron probablemente la primera demostración del valor de la EM para deducir la estructura de moléculas complejas de productos naturales (López, 2008).

Por ello, para que los ácidos grasos puedan ser analizados mediante esta técnica es necesaria su conversión a derivados de baja masa molecular como son los ésteres metílicos (Christie, 2013; Cordero, 2011). La NMX-F-017-SCFI-2011 (Alimentos – Aceites y grasas - Determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases en columna empacada método de prueba) (DOF, 2011) indica el uso de BF_3 en MetOH para la obtención de ésteres metílicos; sin embargo, Christie (1993) describe diversos métodos, entre ellos el uso de HCl en MetOH, el cual es menos tóxico que el anterior y menos dañino al ambiente. En la

Figura 2.5. se muestra un esquema general de cómo se lleva a cabo el análisis por medio de CG-EM, mientras que en la Figura 2.6. se observa un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (ANALISYC, 2014).

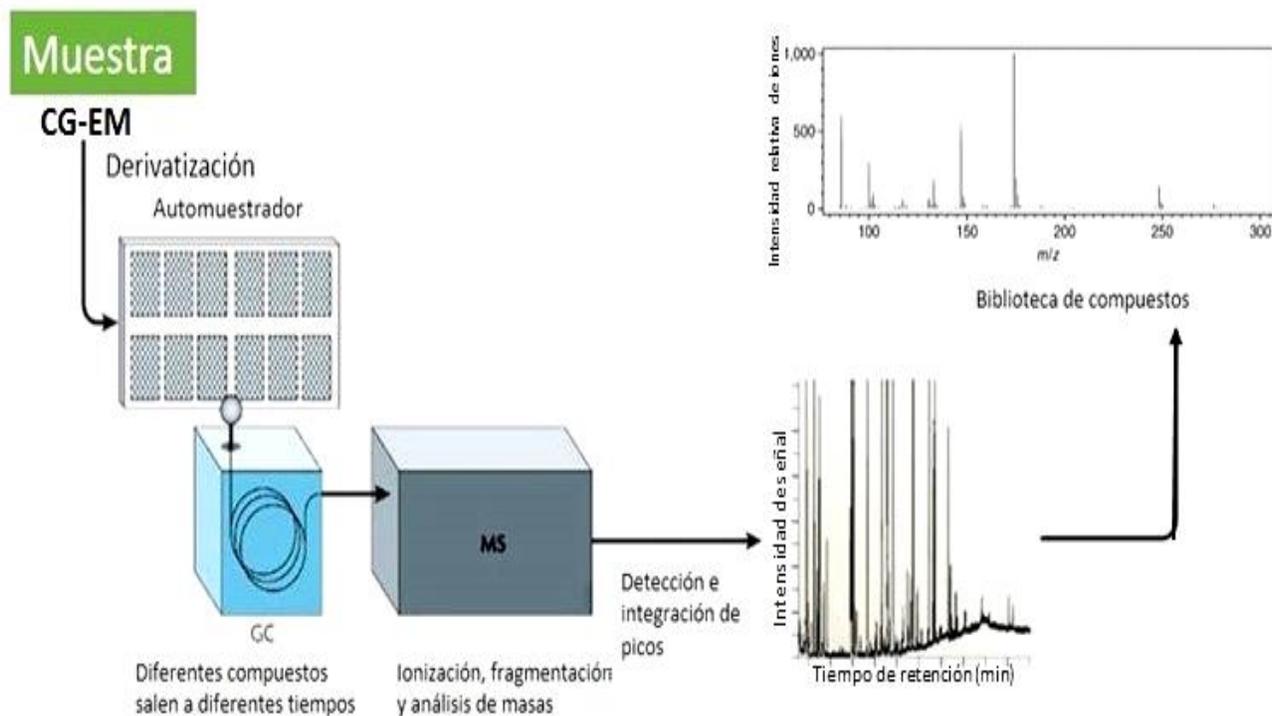


Figura 2.5. Análisis por CG-EM (Modificado de Last y col., 2007)



Figura 2.6. Cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas cuadrupolar (ANALISYC, 2014)

2.3.3.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CLAR-EM)

Una técnica más reciente que se podría aplicar es la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR, por sus siglas en español o *HPLC*, por sus siglas en inglés) acoplada a espectrometría de masas (EM, por sus siglas en español o *MS*, por sus siglas en inglés). Los sistemas CLAR-EM facilitan el análisis de muestras que tradicionalmente han sido difíciles de analizar por CG-EM; es decir, analitos poco volátiles tales como los triacilgliceroles, separando las especies por polaridad más que por punto de ebullición. El CLAR-EM también puede analizar las especies de ácidos grasos típicamente analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), con la ventaja de un procedimiento de preparación simplificado (Cañada, 2011; Romanus, 2008).

Los espectros de masas obtenidos por CLAR-EM suelen ser más sencillos que los obtenidos en CG-EM debido a que el nivel de fragmentación de las moléculas es menor. El inconveniente es que los espectros dependen parcialmente de los parámetros de ionización, es decir, que no pueden ser considerados como “huella dactilar” del compuesto y, por tanto, la comparación con colecciones de espectros estándares no es posible. Por esta razón, la comparación del espectro de masas de analitos con patrones debe realizarse en las mismas condiciones de trabajo (Cañada, 2011).

2.3.3.3. Espectrometría de masas de relaciones isotópicas

Mediante esta técnica se puede llevar a cabo el análisis de los isótopos estables de los principales elementos ligeros de la biosfera (C, H, N, O, S). La espectrometría de masas de relación isotópica permite el análisis de las relaciones isotópicas de estos elementos ligeros ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, D/H, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) con la precisión y la exactitud necesarias para medir las pequeñas variaciones en la abundancia isotópica (fraccionamiento), provocadas por múltiples procesos naturales, tanto físicos como químicos. Estos elementos, que tienen una gran importancia desde el punto de vista biológico y geológico, presentan dos o más

isótopos estables, de los cuales el más ligero es el más abundante (Cañada, 2011).

En general, en el sistema de cromatografía de gases con celda de combustión y espectrometría de masas de relaciones isotópicas la muestra es introducida en el cromatógrafo de gases, donde se vaporiza y se realiza la separación cromatográfica de los componentes de la muestra. El eluyente que procede del cromatógrafo de gases atraviesa un horno de combustión donde se produce la reacción de combustión de la materia orgánica dando lugar fundamentalmente a dióxido de carbono y agua. El dióxido de carbono (CO_2) generado tendrá la misma relación carbono 13/carbono 12 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) que el compuesto original del que proviene. El CO_2 generado en la combustión se introduce en el espectrómetro de masas junto con un flujo de helio, como gas portador. Por otro lado, se introduce también en el espectrómetro un flujo continuo de gas de referencia, generalmente CO_2 . En la fuente de ionización las moléculas de dióxido de carbono son ionizadas dando lugar a los iones $^{12}\text{C}_{16}\text{O}_2$ y $^{13}\text{C}_{16}\text{O}_2$. Mediante un electroimán se dirige el haz hacia un sistema de colectores, donde se detectan de manera simultánea las diferentes trazas de las formas isotópicas generadas. Se determina así la diferencia en la composición isotópica entre los dos gases (muestra y gas de referencia). El enriquecimiento isotópico viene dado por el exceso de una especie isotópica (carbono 13 o ^{13}C) en una muestra comparado con la misma especie isotópica en el gas de referencia (AEA, 2014). Esta técnica avanzada es excelente para identificar el origen de las grasas animales, ya que es posible distinguir entre grasas de rumiantes (por ejemplo ovejas y vacas) y grasas porcinas porque reflejan las diferencias en su metabolismo y fisiologías. También es posible discriminar así entre tejido adiposo de rumiantes y grasas lácteas a través de la relación de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (Romanus, 2008).

CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA

3.1. Origen de la muestra arqueológica

El día 4 de abril del año de 1998, se llevó a cabo una excavación en la planicie aluvial de San Lorenzo Tenochtitlán. En el transcurso de la intervención (sondeo 8) se recuperó el rasgo #4 de un fogón. El espacio en el que apareció parece corresponder a un islote de la llanura norte de San Lorenzo. Esta muestra arqueológica se empleó en este estudio.

En un inicio, para poder establecer la metodología a seguir y posteriormente proceder con la extracción de ácidos grasos del fragmento de fogón proporcionado por el Instituto de Investigaciones Antropológicas con aproximadamente 3000 años de antigüedad (Imagen 3.1) sin el riesgo de dañar la muestra, se llevó a cabo un experimento piloto.

Evidencia arqueológica sugiere que el fogón fue empleado para la preparación y preservación de alimentos, utilizando métodos como el secado y el ahumado (Cyphers y col., 2013); por tal antecedente, se decidió realizar el ahumado de muestras de pescado (mojarra-tilapia) en ollas de barro adquiridas en el mercado de Sonora de la ciudad de México.

En la Figura 3.1 se muestra el diagrama general de la metodología de todo el estudio y en la Figura 3.2 se muestra la metodología seguida en el experimento piloto. Cabe mencionar que las determinaciones se realizaron por duplicado y de forma cualitativa.



Imagen 3.1. Fragmento de fogón con aproximadamente 3000 años de antigüedad

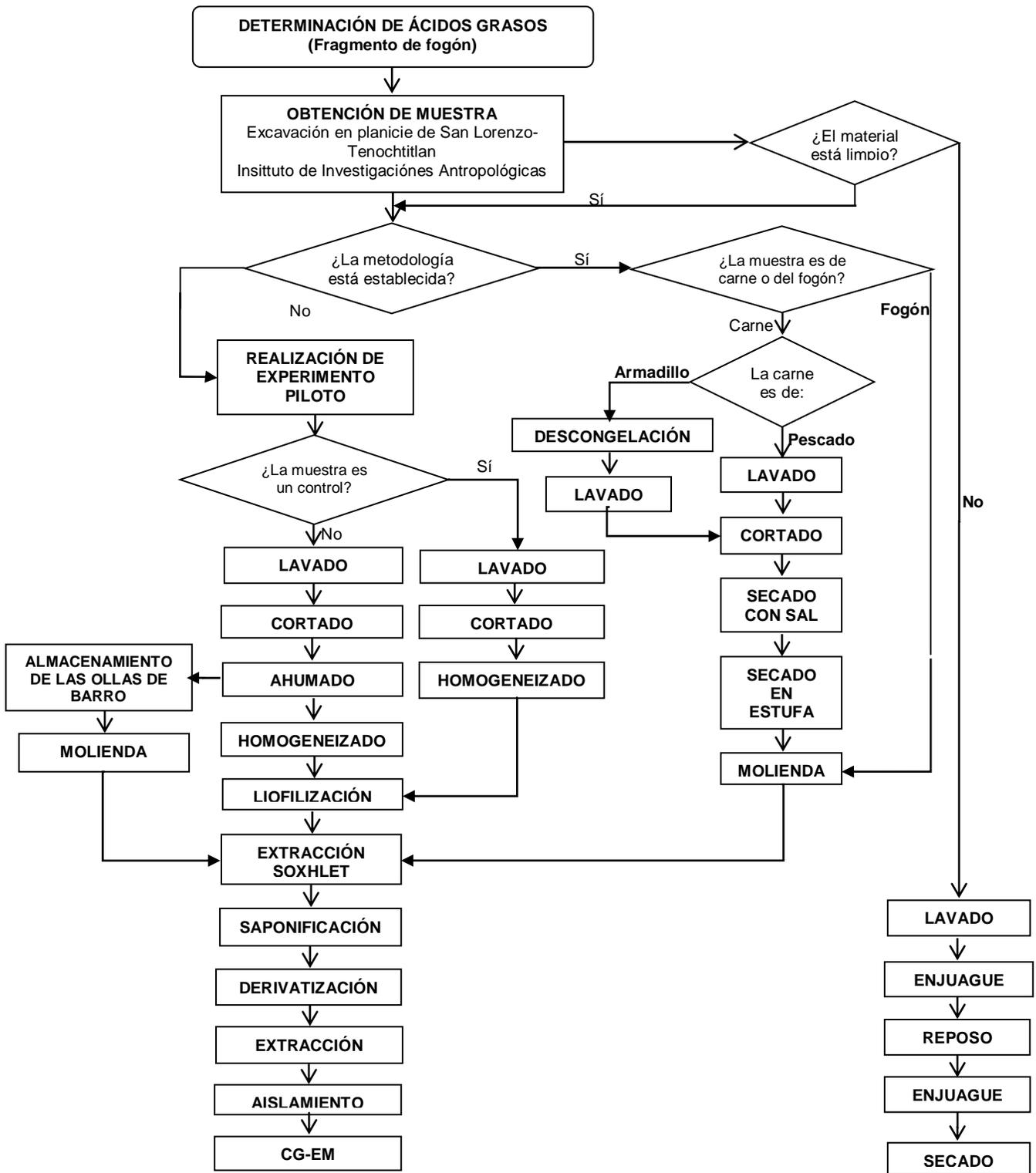
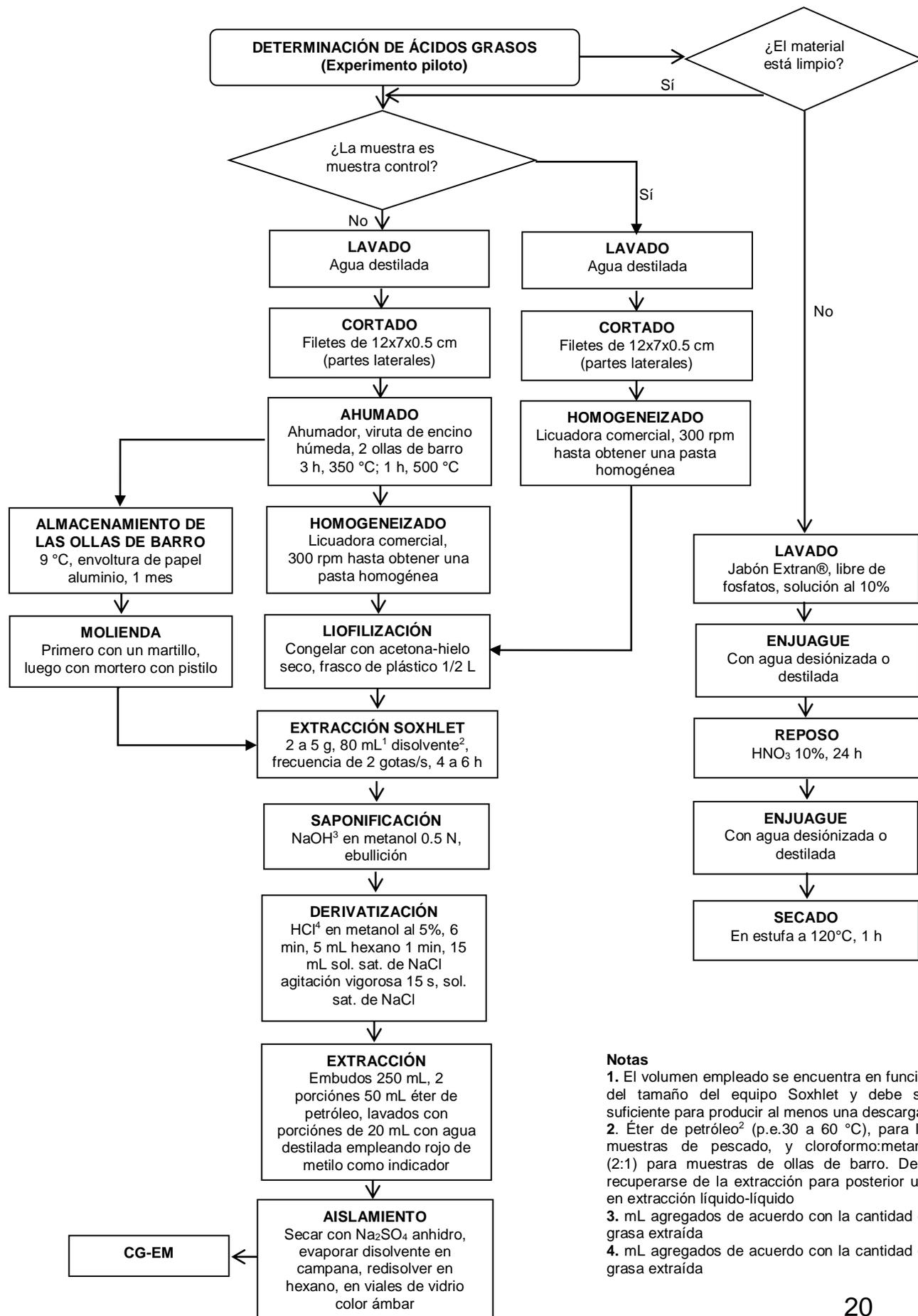


Figura 3.1. Diagrama del proceso general seguido en el análisis de los ácidos grasos del fragmento de fogón



Notas

1. El volumen empleado se encuentra en función del tamaño del equipo Soxhlet y debe ser suficiente para producir al menos una descarga
2. Éter de petróleo² (p.e.30 a 60 °C), para las muestras de pescado, y cloroformo:metanol (2:1) para muestras de ollas de barro. Debe recuperarse de la extracción para posterior uso en extracción líquido-líquido
3. mL agregados de acuerdo con la cantidad de grasa extraída
4. mL agregados de acuerdo con la cantidad de grasa extraída

Figura 3.2. Diagrama de proceso para la determinación de los ácidos grasos de pescado y de las ollas de barro (experimento piloto)

3.2. Descripción detallada de la metodología del experimento piloto

1) Lavado y cortado de las muestras de mojarra-tilapia (*Oreochromis sp.*)

Para realizar la preparación de las muestras control de pescado, fueron cortadas con unas tijeras, en pedazos de aproximadamente 14x2.8x0.5 cm; lavadas con agua destilada y escurridas durante 5 min para pesarse después.

Para realizar la preparación de las muestras de pescado para el ahumado, fueron cortadas con unas tijeras, en pedazos de aproximadamente 14x2.8x0.5 cm; lavadas con agua destilada y escurridas durante 5 min para pesarse después. Posteriormente, fueron atravesadas con ayuda de un alambre galvanizado y fueron colgadas a lo largo del diámetro de la olla del ahumador, el cual fue tapado para proceder a realizar el ahumado como se describe en el inciso 2)

2). Proceso de ahumado en las muestras de pescado

Para realizar el proceso de ahumado se armó un ahumador provisional como se aprecia en la Imagen 3.2, que permitiera ahumar la muestra de pescado. El pescado que se ahumó fue mojarra-tilapia (*Oreochromis sp.*) adquirida en la Tienda UNAM, México. Al mismo tiempo se colectaron los exudados que pudiera desprender. Para ello se emplearon un par de ollas de barro adquiridas en el mercado de Sonora de la ciudad de México de 11 cm de alto, con una base redonda de 4.4 cm de diámetro y una abertura en la parte superior de 6 cm. Para el ahumado se emplearon aproximadamente 150 g de virutas de encino (madera de tipo no resinoso) humedecidas con 400 mL de agua de la llave con la finalidad de favorecer la formación de humo y evitar que éstas se quemaran. Por otro lado, la temperatura de la parrilla fue ajustada a 350 °C ya que con esta temperatura se obtenía una temperatura interna de aproximadamente 50 °C, y a una temperatura externa de 500 °C se obtenía una interna de 80 °C (tomadas en el interior con un termómetro). De acuerdo con Tomé y col. (1999), en la primera

etapa, que fue la realizada en este caso a una temperatura de 50 °C, la temperatura no debería de elevarse demasiado para evitar la desnaturalización de las proteínas con el consecuente endurecimiento de la superficie del pescado, lo que impide la evaporación del agua que se encuentra en las capas internas del músculo. Las condiciones antes mencionadas se resumen en la Tabla 3.1.

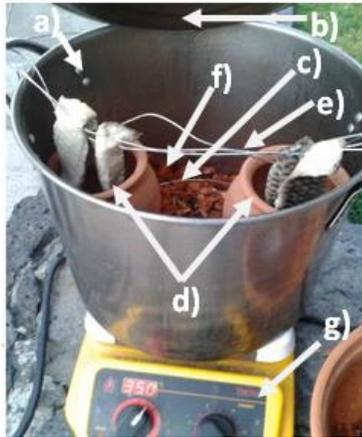


Imagen 3.2. Ahumador que consta de a) olla de acero inoxidable, b) tapa de acero inoxidable, c) rejilla de metal de aprox. 20 cm de diámetro, d) dos ollas de barro sin barnizar, e) alambre galvanizado de calibre #16, f) aserrín de encino y g) parrilla eléctrica de calentamiento

Tabla 3.1. Ahumado artesanal

Hora	Temperatura de parrilla, °C	Temperatura del sistema, °C	Observaciones
00:00 h	350	≈ 50	Inicio del ahumado
00:00h-03:00 h	350	≈ 50	Mantenimiento de la temperatura
03:00 h-4:00 h	500	≈ 100	Aumento de la temperatura
04:00 h	500	≈ 100	Fin del ahumado

3) Homogeneizado de las muestras de pescado

Una vez obtenidas las muestras de pescado (ahumadas y control), se pesaron y se molieron a 300 rpm con ayuda de una licuadora comercial, para colocarse en recipientes de plástico blanco con tapa, con capacidad de 500 mL, poniéndolas en una mezcla de acetona con hielo seco (CO₂) para generar un baño refrigerante, y congelarlas a -30 °C.

4) Liofilización de las muestras de pescado

Una vez congeladas las muestras de pescado (ahumadas y control) fueron

liofilizadas en una liofilizadora de la marca LABCONCO, modelo Free Zone 4.5, durante 21 horas. Las muestras fueron liofilizadas debido a que deben ser sometidas a un pre-tratamiento, ya que los lípidos no pueden ser extraídos con efectividad de los alimentos húmedos y el solvente no puede penetrar fácilmente a los tejidos.

Adicionalmente, ya que no es recomendable que el secado de la muestra se realice a altas temperaturas debido a que algunos lípidos se ligan con las proteínas y con los hidratos de carbono y, por lo tanto, hacen más difícil la extracción con disolventes orgánicos, la liofilización fue seleccionada como método de secado debido a que se ha visto que este proceso aumenta la superficie o área de contacto, proporcionando una mejor extracción de los lípidos (Yáñez, 2003).

5) Almacenamiento de las ollas de barro previo a la extracción Soxhlet

Las ollas de barro que contenían los exudados desprendidos por el pescado durante el ahumado, fueron almacenadas para protegerse del ambiente y de la luz, a una temperatura de -9 °C, durante un mes.

6) Molienda de las ollas de barro previa a la extracción Soxhlet

La molienda se llevó a cabo en las dos ollas con residuos de pescado y en un par de ollas sin residuos, las cuales fungieron como estándar. Las ollas, se fragmentaron con un martillo y, posteriormente, se realizó la molienda con un mortero y pistilo, siendo importante una reducción en el tamaño de partícula debido a que la eficiencia de la extracción lipídica mejora con un menor tamaño de partícula (Yáñez, 2003).

7) Extracción Soxhlet de los ácidos grasos de las ollas de barro y de las muestras de pescado

Los principales constituyentes de las grasas y los aceites son ácidos grasos que usualmente se encuentran en la naturaleza como triacilglicéridos (constan de tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol mediante

enlaces ésteres). Su insolubilidad en agua y la abundancia relativa en comparación con otras clases de lípidos, tales como esteroides y ceras, hace que los ácidos grasos sean adecuados para el análisis de residuos, como se mencionó en el capítulo anterior, el análisis de ácidos grasos es un método relativamente rápido, barato y accesible para la obtención de una caracterización de un residuo arqueológico. Es especialmente valioso cuando se trata de los restos materiales de las culturas de los períodos para los cuales no hay historia escrita (Malainey, 2007). Por ello, para poder obtenerlos, primero es necesario extraer el material lipídico de las muestras para, posteriormente, aislarlos e identificarlos. Se empleó en esta investigación el método Soxhlet para la extracción del material lipídico.

Para realizar la extracción Soxhlet, se colocaron 4 matraces bola de fondo plano a masa constante con perlas de ebullición en una estufa durante 2 h a 100 °C. Se pesaron de 3 a 5 g de muestra sobre papel filtro, enrollándolo y colocándolo en un cartucho de celulosa, tapándose con algodón (evitando que el algodón tocara la muestra) y colocándose el cartucho en el extractor Soxhlet. Se conectó el matraz al extractor, donde se encontraba el cartucho con la muestra, y se conectó al refrigerante poniéndose grasa en las juntas con la finalidad de evitar interferencias con la muestra. Posteriormente, se agregó la cantidad suficiente de disolvente (éter de petróleo, p.e. 30 a 60 °C, para el caso de las muestras de pescado, y clorofomo:metanol en una relación 2:1, para las muestras de las ollas de barro) y se calentó el matraz mediante una parrilla de calentamiento hasta que se hizo una ebullición suave. La extracción de las muestras de pescado se realizó durante 5 h y para las muestras de las ollas se mantuvo durante 3 h (Cañabate y Sánchez, 1995; Malainey, 2007; Passi y col., 1981). Una vez concluido el tiempo de extracción, se recuperó el disolvente en una campana.

Para verificar que se había extraído toda la grasa, se dejó caer una gota de la descarga sobre el papel filtro, y si al evaporarse el disolvente, no se observaba residuo de grasa, indicaba que la extracción había terminado.

Una vez extraída toda la grasa, se quitó el cartucho con la muestra desengrasada y se continuó el calentamiento hasta la total eliminación del disolvente, recuperándolo antes de que se descargara.

Finalmente, se quitó el matraz y se evaporó el disolvente remanente en una campana de extracción para calcular el porcentaje de grasa mediante la siguiente fórmula química:

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{P - p}{M} \quad (3.1)$$

donde:

P = Masa en gramos del matraz con grasa

p = Masa en gramos del matraz sin grasa

M = Masa en gramos de la muestra

8) Saponificación de los ácidos grasos de las ollas de barro y de las muestras de pescado

Las metodologías para realizar la saponificación de la muestra, la derivatización de los ácidos grasos y la obtención de los ésteres metílicos fueron obtenidas de las normas NMX-F-089-S-1978 y NMX-F-017-SCFI-2011, con algunas modificaciones realizadas a lo largo de su montaje. Cabe mencionar que la NMX-F-017-SCFI-2011, utilizada para la obtención de los ésteres metílicos, fue modificada con la finalidad de emplear reactivos más amigables con el ambiente, tal como se cita en los siguientes párrafos.

Para realizar la saponificación de la muestra se agregó a la grasa obtenida en el matraz de bola, previa extracción en un equipo Soxhlet y de acuerdo con las cantidades establecidas en la Tabla 3.2, NaOH 0.5 N en metanol, conectándose el matraz a un condensador para calentar la mezcla en una parrilla hasta que los glóbulos de grasa se mezclaran con el NaOH y formaran una sola fase.

9) Derivatización de ácidos grasos de las ollas de barro y de las muestras de pescado

Posteriormente, (derivatización) se agregó HCl (acuoso) al 5% en metanol (en vez de trifluoruro de boro que es el que recomienda utilizar la NMX-F-017-SCFI-2011), de acuerdo con las cantidades que aparecen en la Tabla 3.2 y según lo establecido por López (2008), manteniéndose en ebullición durante 6 min, de acuerdo con Marrero (2006). Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 5 mL de hexano a través del condensador y se mantuvo a ebullición durante 1 min más. Pasado ese tiempo se desconectó el condensador y se agregaron 15 mL de solución saturada de NaCl, se tapó el matraz y se agitó vigorosamente durante 15 s mientras la solución se encontraba aún tibia.

Finalmente, se agregó suficiente solución saturada de NaCl para que la solución de hexano con los ésteres metílicos flotara en el cuello del matraz.

Tabla 3.2. Cantidad de reactivos a emplear de acuerdo con la masa de la grasa extraída (Experimento piloto)

Muestra (mg)	NaOH metanólico 0.5N (mL)	HCl metanólico 5% (mL)
100-250	4	5
250-500	6	7
500-750	8	9
750-1000	10	12

10) Obtención (extracción) de los ésteres metílicos de las ollas de barro y de las muestras de pescado

Para poder caracterizar los ésteres metílicos en el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas, fue necesario realizar su recobro, por lo cual, se transfirió la mezcla (muestras de ésteres metílicos, las fases de sal y de hexano) a un embudo de separación de 250 mL, en donde se realizaron 2 extracciones líquido-líquido cada una con porciones de 50 mL de éter de petróleo recuperado.

Los extractos fueron lavados con porciones de 20 mL de agua hasta que estuvieran libres de ácido (se comprobó el agua con indicador rojo de metilo).

11) Aislamiento de ésteres metílicos de las ollas de barro y de las muestras de pescado

La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y el disolvente se recuperó en un equipo de roto-evaporación.

Finalmente, los ésteres metílicos fueron redisolventes en 3 mL de hexano grado cromatográfico y colocados en viales de vidrio color ámbar.

12) Determinación de los ésteres metílicos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) de las ollas de barro y de las muestras de pescado fresco y ahumado

Para la identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos, se utilizó un cromatógrafo de gases de la marca Agilent, modelo 6890N, con una columna capilar de fase DB-5MS (5% fenil-metilsilicón), de una longitud de 10 m, diámetro interno (D.I.) de 0.18 mm y un espesor de película de 0.18 μ , acoplado a un espectrómetro de masas marca LECO, modelo Pegasus 4D, con un modo de ionización de impacto electrónico (*EI*, por sus siglas en inglés). La detección de los ésteres metílicos se realizó mediante una inyección conocida por su nombre en inglés como *Split-splitless*. Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada muestra.

Las condiciones que se tuvieron al realizar los análisis cromatográficos fueron: temperatura de inyector 300 °C, temperatura del horno de 100 °C durante 1.7 min, después se llevó hasta 300 °C con una razón de 20 °C/min, durante 10 min. El gas de arrastre fue helio grado cromatográfico, la temperatura de la fuente de ionización fue de 200 °C. Los resultados de los ácidos grasos se presentaron de forma cualitativa y las inyecciones fueron realizadas por personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química de la UNAM. Los

compuestos fueron identificados con ayuda del software del equipo (*ChromaTOF*), con la biblioteca virtual disponible en la página electrónica *Mass Spectrometry of Fatty Acid Derivatives* (Christie, 2013), con los tiempos de retención arrojados por los cromatogramas y con el ión molecular característico de cada compuesto. El programa de temperatura empleado se detalla en la Tabla 3.3

Tabla 3.3. Programa de temperaturas establecidas en el equipo (CG-EM)

Temperatura inicial	100 °C
Tiempo inicial	1.7 min
Rampa de calentamiento	20 °C/min
Temperatura final	300 °C
Tiempo final	10 min
Temperatura de línea de transferencia	200 °C
Temperatura del inyector	300 °C

Como fue mencionado en el inicio del capítulo, en el experimento piloto sólo se emplearon muestras representativas de mojarra-tilapia y de la muestra arqueológica (fragmento del fogón) y una vez que se estableció la metodología a emplear, se realizó la misma metodología de extracción de material lipídico y de la obtención de los ésteres metílicos pero en la muestra proporcionada por personal del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM, quienes colaboraron en este proyecto. Así, establecida la metodología a seguir, y realizado el experimento piloto, se analizó el fragmento del fogón hallado, con la finalidad de poner a prueba la hipótesis de que dicho elemento se haya utilizado para ahumar alimentos proteínicos como, por ejemplo, pescado. Adicionalmente, se decidió comparar los resultados obtenidos del análisis de los ácidos grasos del fogón no sólo con el análisis del contenido de lípidos de mojarra-tilapia (*Oreochromis sp.*), sino también con otra especie típica actual de la zona: armadillo (*Dasypus novemcinctus*). Cabe mencionar que todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado y de forma cuantitativa.

A continuación se describe en la Figura 3.3 la metodología seguida para la determinación de ácidos grasos de pescado, armadillo y del fragmento de fogón.

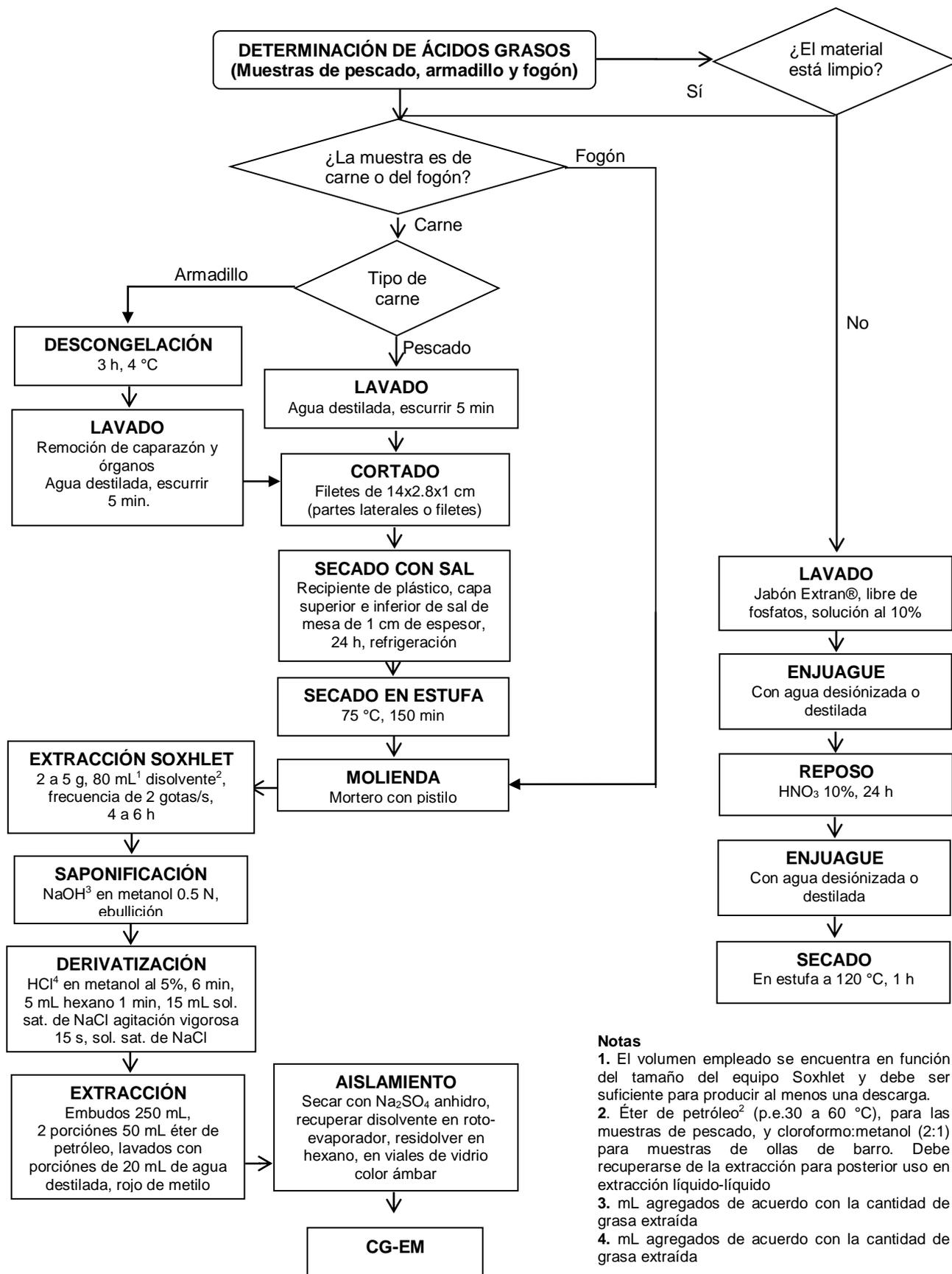


Figura 3.3. Diagrama de proceso para la determinación de los ácidos grasos de pescado, armadillo y del fragmento de fogón

3.3. Descripción detallada de la metodología del experimento empleando la muestra arqueológica y las muestras de 2 especies típicas actuales de la zona de San Lorenzo, Veracruz: mojarra-tilapia y armadillo (*Dasyus novemcinctus*)

A) Lavado y cortado de las muestras de pescado y de armadillo

Estas muestras fueron adquiridas, la primera en la Tienda UNAM de la Ciudad Universitaria y la segunda en el Mercado de San Juan de la Ciudad de México. Fueron cortadas en pedazos de aproximadamente 14x2.8x1 cm; se retiraron las vísceras y caparazón en el caso del armadillo; finalmente, fueron lavadas con agua destilada, y escurridas durante 5 min.

B) Secado con sal y en estufa de las muestras de pescado y de armadillo

Con los mismos objetivos del experimento piloto, al someter las muestras bajo un pre-tratamiento, es decir, obtener muestras secas para aumentar la eficiencia de la extracción de los lípidos, se colocaron las muestras de carne de pescado y armadillo, en recipientes de plástico que contenían una capa de sal de mesa, de aproximadamente 1 cm de espesor y se cubrieron con una capa de la misma de igual manera, se tapó el recipiente y se dejó durante 24 h en el refrigerador; transcurrido ese tiempo, se sacó la carne de pescado y de armadillo del recipiente, se sacudieron suavemente para retirar el exceso de sal y posteriormente se introdujeron en la estufa a una temperatura de 75 °C durante 2 horas y media.

C) Molienda de las muestras de pescado y de armadillo

Una vez obtenidas las muestras de pescado y armadillo secas, se molieron en un mortero (Profeco, 2012). Es necesario aclarar que en éste experimento, se decidió cambiar el método de pre-secado o pre-tratamiento (lío-filización) de las muestras de carne de pescado y de armadillo, por el de secado en estufa, aproximándose más a la posible forma de secado que hayan tenido los habitantes de la región de San Lorenzo y no propiamente a

la liofilización. Por otra parte, es importante aclarar que otra de las razones por la cual ya no se realizó el ahumado, fue debido a que los resultados arrojados en el experimento piloto, mostraron una extracción de ácidos grasos (ésteres metílicos) muy similares, tanto en las muestras de pescado ahumado como en las de pescado fresco, lo cual indica que éstos no sufrieron alteraciones durante dicho proceso. En realidad, el ahumado sólo permitió que las extracciones se realizaran de manera más eficiente.

D) Preparación de la muestra del fragmento de fogón previa extracción Soxhlet

Para este análisis se realizó el raspado de la muestra del resto del fogón proporcionado por el Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM (que correspondía a un fragmento de aproximadamente 17x12x6 cm de grosor), con ayuda de una espátula y un cincel, de cuatro diferentes partes del mismo, y, posteriormente, fueron molidas y pulverizadas en un mortero con pistilo, almacenándose cada una de las cuatro muestras, en bolsas de plástico debidamente etiquetadas y al resguardo de la luz.

E) Extracción Soxhlet de las muestras de pescado, armadillo y las muestras del fragmento del fogón

Para realizar la extracción Soxhlet, se colocaron 4 matraces bola de fondo plano a masa constante con perlas de ebullición en una estufa durante 2 h a 100 °C. Se pesaron de 3 a 5 g de muestra sobre papel filtro, enrollándolo y colocándolo en un cartucho de celulosa, tapándose con algodón (evitando que el algodón tocara la muestra) y colocándose el cartucho en el extractor Soxhlet. Se conectó el matraz al extractor, donde se encontraba el cartucho con la muestra, y se conectó al refrigerante no poniéndose grasa en las juntas con la finalidad de evitar interferencias con la muestra.

Posteriormente, se agregó la cantidad suficiente de disolvente (éter de petróleo, p.e. 30 a 60°C, para el caso de las muestras de pescado y armadillo y clorofomo:metanol en una relación 2:1, para las muestras de

fogón) y se calentó el matraz mediante una parrilla de calentamiento hasta que se realizara una ebullición suave. La extracción de las muestras de pescado se realizó durante 5 h y para las muestras de fogón, se mantuvo durante 3 h (Cañabate y Sánchez, 1995; Malainey, 2007; Passi y col., 1981). Una vez concluido el tiempo de extracción, se recuperó el disolvente en una campana.

Para verificar que se había extraído toda la grasa, se dejó caer una gota de la descarga sobre el papel filtro y si al evaporarse el disolvente no se observaba residuo de grasa era que la extracción había terminado. Una vez extraída toda la grasa se quitó el cartucho con la muestra desengrasada y se continuó el calentamiento hasta la total eliminación del disolvente, recuperándolo antes de que se descargara.

Finalmente, se quitó el matraz y se evaporó el disolvente remanente en una campana de extracción para calcular el porcentaje de grasa mediante la fórmula química ya señalada anteriormente:

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{P - p}{M} \quad (3.1)$$

donde:

P = Masa en gramos del matraz con grasa

p = Masa en gramos del matraz sin grasa

M = Masa en gramos de la muestra

F) Saponificación de ácidos grasos de las muestras de pescado, armadillo, y de las muestras del fragmento del fogón

De acuerdo con lo escrito en el punto 3.2, las metodologías para realizar la saponificación de la muestra, la derivatización de los ácidos grasos y la obtención de los ésteres metílicos fueron obtenidas de las normas NMX-F-089-S-1978 y NMX-F-017-SCFI-2011, con algunas modificaciones realizadas a lo largo de su montaje.

Para la saponificación de la muestra se agregó a la grasa obtenida en el matraz de bola, previa extracción en un equipo Soxhlet y de acuerdo

con las cantidades establecidas en la Tabla 3.2, NaOH 0.5 N en metanol, conectándose el matraz a un condensador para calentar la mezcla en una parrilla hasta que los glóbulos de grasa se mezclaran con el NaOH y formaran una sola fase.

G) Derivatización de ácidos grasos de las muestras de pescado, armadillo, y de las muestras del fragmento del fogón

Para llevar a cabo la derivatización, se agregó HCl (acuoso) al 5% en metanol (en vez de trifluoruro de boro que es el que recomienda utilizar la NMX-F-017-SCFI-2011), de acuerdo con las cantidades establecidas en la Tabla 3.2 y según lo señalado por López (2008), manteniéndose en ebullición durante 6 min, según el tiempo sugerido por Marrero (2006). Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 5 mL de hexano a través del condensador y se mantuvo a ebullición durante 1 min más. Pasado ese tiempo se desconectó el condensador y se agregaron 15 mL de solución saturada de NaCl, se tapó el matraz y se agitó vigorosamente durante 15 s mientras la solución se encontraba aún tibia. Finalmente, se agregó suficiente solución saturada de NaCl para que la solución de hexano con los ésteres metílicos flotara en el cuello del matraz.

H) Obtención (extracción) de los ésteres metílicos de las muestras de pescado, armadillo, y de las muestras del fragmento del fogón

Para poder caracterizar los ésteres metílicos en el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas, fue necesario realizar su recobro, por lo cual, se transfirió la mezcla (muestras de ésteres metílicos, las fases de sal y de hexano) a un embudo de separación de 250 mL, en donde se realizaron 2 extracciones líquido-líquido cada una con porciones de 50 mL de éter de petróleo recuperado. Los extractos fueron lavados con porciones de 20 mL de agua hasta que estuvieron libres de ácido (se comprobó el agua con indicador rojo de metilo).

I) Aislamiento de los ésteres metílicos de las muestras de pescado, armadillo, y de las muestras del fragmento del fogón

La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y el disolvente se recuperó en un equipo de roto-evaporación. Finalmente, los ésteres metílicos fueron redisueltos en 3 mL de hexano grado cromatográfico y colocados en viales de vidrio color ámbar.

J) Determinación de los ésteres metílicos de las muestras de armadillo, de pescado y de las muestras del fragmento de fogón

Al igual que en el punto 3.1 inciso 8, para la identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos, se utilizó un cromatógrafo de gases de la marca Agilent, modelo 6890N, con una columna capilar de fase DB-5MS (5% fenil-metilsilicón), de una longitud de 10 m, diámetro interno (D.I.) de 0.18 mm y un espesor de película de 0.18 μ , acoplado a un espectrómetro de masas marca LECO, modelo Pegasus 4D, con un modo de ionización de impacto electrónico (*EI*, por sus siglas en inglés). La detección de los ésteres metílicos se realizó mediante una inyección conocida por su nombre en inglés como *Split-splitless*. Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada muestra. Las condiciones que se tuvieron al realizar los análisis cromatográficos fueron: temperatura de inyector 300 °C, temperatura del horno de 100 °C durante 1.7 min, después se llevó hasta 300 °C con una razón de 20 °C/min, durante 10 min. El gas de arrastre fue helio grado cromatográfico, la temperatura de la fuente de ionización fue de 200 °C. Los resultados de los ácidos grasos se presentaron de forma porcentual y las inyecciones fueron realizadas por personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química de la UNAM. Los compuestos fueron identificados con ayuda del software del equipo (*ChromaTOF*), con la biblioteca virtual disponible en la página electrónica *Mass Spectrometry of Fatty Acid Derivatives* (Christie, 2013), con los tiempos de retención obtenidos por los cromatogramas y con el ión molecular característico de cada compuesto.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de las muestras de pescado y ollas de barro el experimento piloto

1) Lavado y cortado de las muestras de mojarra-tilapia (*Oreochromis sp.*)

En la imagen 4.1 se observa la forma en que fueron cortadas las muestras de pescado; también, se observa su apariencia antes de ser ahumadas (en el caso de las que no fueron muestras control) y liofilizadas.



Imagen 4.1. Muestras de filete de pescado antes de ahumar

2) Proceso de ahumado en las muestras de pescado

En la Imagen 4.2 se aprecia el ahumador diseñado en el laboratorio, donde fueron ahumadas las muestras de pescado en las vasijas de barro, mientras que en la Tabla 4.1 se tienen los datos de las masas del pescado y de las ollas antes y después del proceso de ahumado. En las muestras se aprecia una disminución de sus masas después del proceso de ahumado, el cual fue un poco más de la mitad de su masa original, debido a que mediante el proceso de ahumado, ocurre una deshidratación de la carne y sus líquidos (grasa, proteínas solubles, etc.) quedando estos últimos depositados en el fondo de las ollas de barro que se encontraban en el interior del ahumador (olla de acero). La pérdida de masa debida principalmente a la evaporación del agua es la esperada en los procesos de ahumado (Imágenes 4.2 y 4.3);

así mismo se comprobó que la pérdida de masa se debe principalmente a ello, ya que la masas de los residuos depositados en el interior de las ollas son menores a las masas de las muestras de pescado perdidas, es decir, el porcentaje depositado en las ollas 1 y 2, tan sólo corresponde a un 0.38 y 1.91% respectivamente, mientras que la masa perdida, también principalmente por evaporación de agua, en las muestras de pescado 1 y 2 es de un 54.8 y 65.1%, respectivamente.



Imagen 4.2. Muestras de filete de pescado después del proceso de ahumado

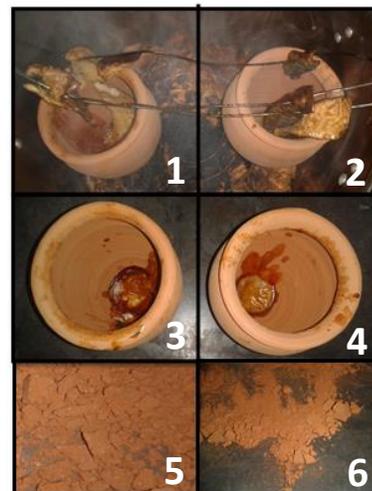


Imagen 4.3. Ollas de barro. Lado izquierdo olla 1 (1). Lado derecho, olla 2 (2). En la parte superior (1 y 2), ahumado de mojarra-tilapia en ollas de barro. En la parte central (3 y 4), ollas con los residuos de pescado (lípidos y otros compuestos). En la parte inferior (5 y 6) muestras pulverizadas

Tabla 4.1. Masa de pescado y de las ollas de barro antes y después de ser sometidas al proceso de ahumado

		Masa antes de ahumar (g)	Masa después de ahumar (g)	% Masa transferida del pescado a las ollas
Pescado	1	51.8	28.4	54.8
	2	44.4	28.9	65.1
Olla	1	210.5	211.3	0.38
	2	219.3	223.5	1.91

3) Homogeneizado y liofilización de las muestras de pescado

En la imagen 4.4 se puede apreciar las muestras de pescado después del proceso de homogeneizado, así como de liofilización. Como se aprecia en la Tabla 4.2, el porcentaje de humedad de las muestras que se ha perdido

debido a la liofilización realizada también es alto, por arriba del 50% de sus masas, lo cual resulta importante debido a que los lípidos no podrían ser extraídos con facilidad de los alimentos húmedos, ya que el disolvente no penetraría fácilmente en los tejidos húmedos. Por ello, es recomendable realizar un pre-acondicionamiento de la muestra, por ejemplo, liofilizándola (sublimación del agua) antes de proceder a su extracción, ya que así la muestra no tendrá agua libre que pueda interactuar con los lípidos pudiéndose realizar la extracción con mayor facilidad (Imágenes 4.4 y 4.5).

Tabla 4.2. Masa de pescado antes y después de liofilizar

		Masa de pescado antes de liofilizar (g)	Masa de pescado después de liofilizar (g)	Agua perdida (g)	%H
Pescado ahumado	1	28	11.3	16.7	59.6
	2	26.8	9.7	17.1	63.8
Pescado fresco	1	78.7	15.4	63.3	80.4
	2	60.8	11.2	49.6	81.58

Para conocer el porcentaje de humedad se empleó la siguiente ecuación.

$$\%H = \text{masa de agua perdida de la muestra} \left(\frac{100\%}{\text{masa de pescado antes de liofilizar}} \right) \quad (4.1)$$



Imagen 4.4. Muestras de filete de pescado antes y después del proceso de liofilización, respectivamente



Imagen 4.5. Liofilizadora marca Labconco, modelo Free Zone 4.5

4) Molienda de las ollas de barro previa a la extracción Soxhlet

En la imagen 4.3 (5 y 6), es posible observar la apariencia de las ollas de barro, después de ser molidas, para su posterior uso en el experimento piloto.

5) Resultados de la extracción, saponificación, derivatización de las muestras de pescado y de las ollas de barro en el experimento piloto

En la Imagen 4.6 se observa el equipo Soxhlet, empleado para llevar a cabo las extracciones de grasa de las muestras de pescado, y en la Tabla 4.3 se observan los porcentajes de grasa extraída. En esta última se aprecia que los resultados de grasa extraída fueron mayores en el pescado ahumado que en el pescado fresco debido a que, adicionalmente a la liofilización, se obtuvo con el ahumado, como ya se mencionó, un efecto de secado, ya que el calor generado durante el proceso de ahumado contribuye a secar el pescado con la consiguiente disminución de su actividad acuosa (A_w), haciendo que la extracción se realice de una manera más eficiente (Fernández y col., 1995). En las ollas sin residuos de grasa de pescado, se observa un menor porcentaje de grasa extraída, mientras que en las ollas con residuos se observa un mayor porcentaje de grasa extraída, lo cual era de esperarse debido a que en ellas se depositaron los exudados del pescado. La principal causa de que se haya extraído grasa de las ollas de barro sin residuos, se debe a la manipulación de sus fabricantes.



Imagen 4.6. Extracción Soxhlet empleando éter de petróleo, p.e. 30 a 60°C, de muestras de mojarra-tilapia



Imagen 4.7. Material montado para realizar la derivatización de los ácidos grasos de mojarra-tilapia

Por otro lado, en la Tabla 4.4 se aprecia que los ésteres metílicos identificados en las muestras de pescado, coinciden con los reportados en la literatura (Rasoarahona y col., 2005), por lo tanto, son útiles para comparar

con los resultados de las ollas de barro. También se observa que la mayor cantidad de ésteres metílicos se encontró en las muestras de pescado ahumado. Esto podría explicarse ya que el humo posee fenoles que inhiben la autooxidación al actuar como catalizadores negativos, favoreciendo la menor pérdida de los ácidos grasos.

Tabla 4.3. Datos para realizar la extracción de las muestras de pescado liofilizadas y de las ollas de barro con y sin los residuos de pescado

		Masa de muestra (g)	Masa de grasa (g)	Grasa extraída (%)	Volumen de éter de petróleo (mL)*	Volumen de cloroformo: Metanol (2:1) (mL)	Volumen de NaOH 0.5N en metanol (mL)	Volumen de HCl 5% en metanol (mL)
Pescado ahumado	1	2.62	0.50	19.2	185	NA	8	9
	2	2.60	0.60	23.4	100	NA	8	9
Pescado fresco	1	2.55	0.10	4.1	255	NA	4	5
	2	2.24	0.11	5.1	220	NA	4	5
Olla sin residuos	1	3.03	0.05	1.56	NA	255	4	5
	2	3.18	0.05	1.51	NA	200	4	5
Olla con residuos	1	3.09	0.05	1.66	NA	185	4	5
	2	3.15	0.05	1.71	NA	100	4	5

*Como anteriormente se ha mencionado, el volumen del disolvente (éter de petróleo o cloroformo:metanol) depende del tamaño, del equipo extractor y la cantidad agregada debe ser suficiente para al menos realizar una descarga del mismo, NA = No aplica

La derivatización de los ácidos grasos, se llevó a cabo como se muestra en la Imagen 4.7 la cual consistió en transformar éstos en sus correspondientes ésteres metílicos, para conseguir compuestos menos polares y térmicamente más estables ya que de no ser así, no sería posible su análisis por cromatografía de gases. Además, aunque los ácidos grasos pueden encontrarse en la naturaleza en estado libre (no esterificado), en su mayoría se encuentran como ésteres unidos a glicerol, colesterol o alcoholes alifáticos de cadenas largas. En los casos cuando los ácidos grasos se encuentran en estado de ésteres, se debe trans-esterificar el ácido graso. Los ácidos grasos pueden ser esterificados por alcoholes en presencia de un apropiado catalizador ácido (Figura 4.1).

Tabla 4.4. Resumen de los compuestos determinados en muestras de pescado fresco, pescado ahumado y ollas de barro con y sin grasa de pescado, por CG-EM

MUESTRA	COMPUESTOS ENCONTRADOS	Ión molecular (m/z)	MUESTRA	COMPUESTOS ENCONTRADOS	Ión molecular (m/z)		
Pescado fresco 1	1*. Éster metílico del ácido mirístico	242	Pescado fresco 2	Éster metílico del ácido mirístico	242		
	2. Éster metílico del ácido pentadecanoico	256		Éster metílico del ácido pentadecanoico	256		
	3. Éster metílico del ácido palmitoleico	268		Éster metílico del ácido 11-hexadecenoico	268		
	4. Éster metílico del ácido palmítico	270		Éster metílico del ácido palmítico	270		
	5. Éster metílico del ácido heptadecanoico	284		Éster metílico del ácido heptadecanoico	284		
	6. Éster metílico del ácido oleico	296		Éster metílico del ácido oleico	296		
	7. Éster metílico del ácido esteárico	298		Éster metílico del ácido esteárico	298		
	8. Éster metílico del ácido eicosaenoico	324		Colesterol	386		
	9. Colesterol	386					
Pescado ahumado 1	Éster metílico del ácido mirístico	242	Pescado ahumado 2	Éster metílico del ácido mirístico	242		
	Éster metílico del ácido pentadecanoico	256		Éster metílico del ácido palmitoleico	268		
	Éster metílico del ácido palmitoleico	268		Éster metílico del ácido palmítico	270		
	Éster metílico del ácido palmítico	270		Éster metílico del ácido linolénico	292		
	11. Éster metílico del ácido linolénico	292		Éster metílico del ácido oleico	296		
	Éster metílico del ácido oleico	296		Éster metílico del ácido esteárico	298		
	Éster metílico del ácido esteárico	298		Éster metílico del ácido araquidónico	318		
	12. Éster metílico del ácido araquidónico	318		Éster metílico del ácido eicosadienoico	322		
	13. Éster metílico del ácido eicosadienoico	322		Éster metílico del ácido eicosaenoico	324		
	Éster metílico del ácido eicosaenoico	324		Colesterol	386		
	Colesterol	386					
	Olla 1	14. Éster metílico del ácido láurico		214	Olla 2	Éster metílico del ácido palmítico	270
		Éster metílico del ácido mirístico		242			
Éster metílico del ácido pentadecanoico		256					
Éster metílico del ácido palmítico		270					
Éster metílico del ácido heptadecanoico		284					
Olla con grasa 1	Éster metílico del ácido láurico	214	Olla con grasa 2	Éster metílico del ácido mirístico	242		
	Éster metílico del ácido mirístico	242		Éster metílico del ácido pentadecanoico	256		
	Éster metílico del ácido palmitoleico	268		Éster metílico del ácido palmitoleico	268		
	Éster metílico del ácido palmítico	270		Éster metílico del ácido palmítico	270		
	Éster metílico del ácido oleico	296		Éster metílico del ácido heptadecanoico	284		
	Éster metílico del ácido esteárico	298		Éster metílico del ácido oleico	296		
	15. Éster metílico del ácido docosahexaenoico	342		Éster metílico del ácido esteárico	298		
				Éster metílico del ácido eicosatetraenoico	318		
				Éster metílico del ácido docosahexaenoico	342		
				16. Éster metílico del ácido 20-metil-heneicosanoico (iso)	354		
				17. Éster metílico del ácido tetracosanoico	382		
				18. Éster metílico del ácido octacosanoico	438		

Los compuestos se han identificado también con ayuda de la biblioteca virtual, Mass Spectrometry of Fatty Acid Derivatives (Christie, 2013), ** Cada número corresponde a cada uno de los 18 diferentes ésteres metílicos que se lograron identificar. Los tiempos de retención aproximados se encuentran en la Tabla A.1. (ver Anexo 1).

El paso inicial es la protonación del ácido para dar el ión (1), el cual puede sufrir una reacción con el alcohol para dar el intermediario (2) y éste, a su vez, puede perder un protón para convertirse en el éster (3). Cada paso en este proceso es reversible pero, en presencia de un gran exceso del alcohol, el punto de equilibrio de la reacción es desplazado para que la esterificación se realice.

La trans-esterificación ocurre bajo condiciones similares (Figura 4.2). En ella la protonación del éster es seguida por la adición del alcohol para dar el intermediario (4) el cual se disocia para posteriormente dar el éster (6).

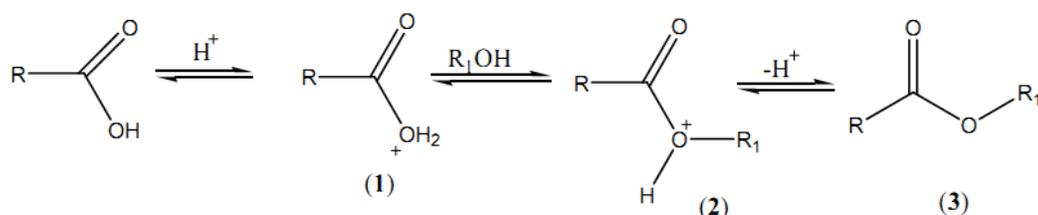


Figura 4.1. Esterificación de ácidos grasos con catálisis ácida

El agua debe ser una vez más excluida. Las condiciones preferidas para realizar la esterificación o trans-esterificación de ácidos carboxílicos son por consiguiente un exceso del alcohol con el que se quiere esterificar y ausencia de agua (López, 2008).

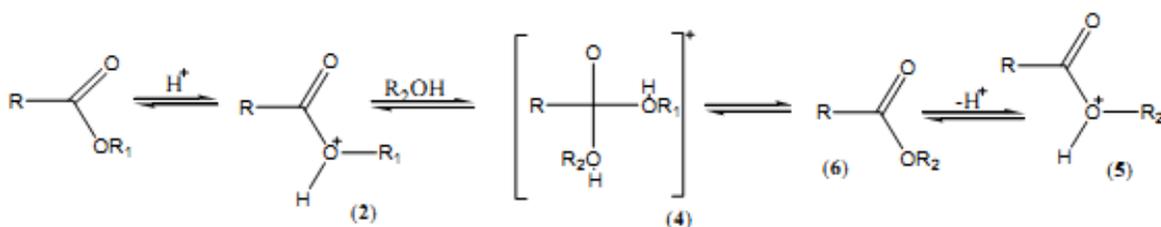


Figura 4.2. Trans-Esterificación de lípidos por catálisis ácida

Para realizar estos dos equilibrios, en este estudio se sustituyó el reactivo de trifluoruro de boro (BF_3), el cual es un disolvente fluorado, por HCl en metanol al 5%, ya que éste es el más citado y usado con más frecuencia en este tipo de reacciones (López, 2008). En la práctica, las pequeñas cantidades de agua formadas no afectan la esterificación significativamente y el reactivo tiene una vida útil de cerca de dos semanas a temperatura ambiente o más larga si se refrigera, contrario al BF_3 que tiene una vida de

anaquel limitada aún cuando se refrigere y el uso de soluciones de dudosa vida de anaquel o demasiado concentradas puede producir otros compuestos químicos y pérdidas de cantidades apreciables de ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, el BF_3 es tóxico, razón por la cual no es recomendable que el analista lo prepare, situación también contraria al HCl en metanol, el cual fue preparado en el laboratorio y, aunque correctamente el reactivo se prepara burbujeando cloruro de hidrógeno gaseoso seco en el metanol anhidro, se observó que eso no fue un factor que ocasionara que las reacciones no se llevaran a cabo. Por el contrario, se observaron resultados satisfactorios y que, a continuación, se presentan. Un ejemplo de cálculo para obtener el porcentaje de grasa es:

$$\%G = \text{masa de grasa extraída} \left(\frac{100\%}{\text{masa de muestra de pescado antes de extraer}} \right) \quad (4.2)$$

6) Resultados del aislamiento y de la determinación de ésteres metílicos por CG-EM del experimento piloto

Para la determinación de los ésteres metílicos empleando CG-EM se transformaron los ácidos grasos en sus derivados metil ésteres en donde se pueden apreciar que en la mayoría de los espectros de masas (Figuras 4.9 a 4.12.) hubo la aparición de una señal $m/z = 74$, correspondiente al reagrupamiento de McLafferty (Figura 4.3) propio de los ésteres metílicos (Christie, 2013), y que representa una reorganización inusual productora de iones $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{CO}^+$ que implica la pérdida de los carbonos α -, β -, γ - como C_3H_7 . Los metilésteres muestran las reacciones esperadas para el grupo carbonilo—adición α (Figura 4.3) y adición β con reorganización del hidrógeno γ (gama) (Figura 4.4). El ión alquilo $(M - 59)^+$ y el ión CH_3O^+ son muy pequeños, excepto los metilésteres de baja masa molecular. Además, la descomposición de la mitad de los alquilos produce los iones característicos $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}^+$ y $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}^+$.

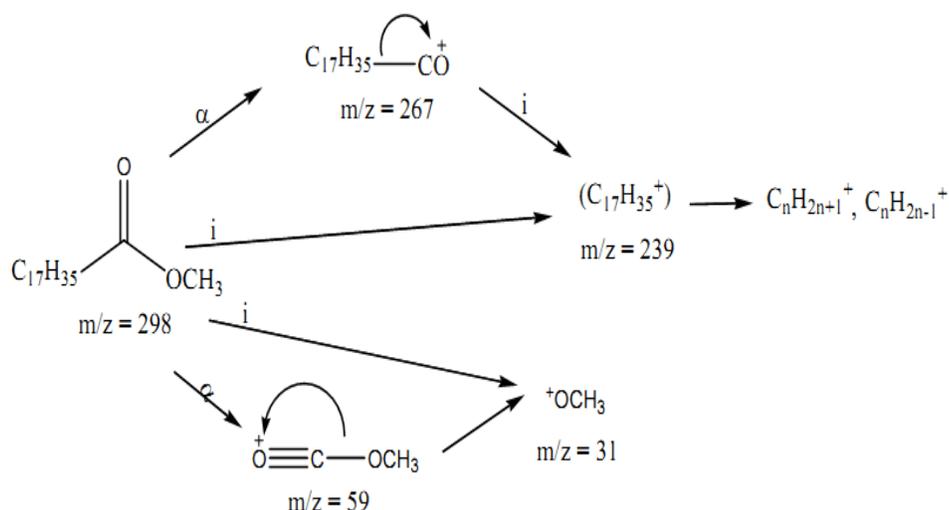


Figura 4.3. Esquema de fragmentación de las muestras mediante impacto electrónico (IE) dando como resultado el ión $(M-3)^+$

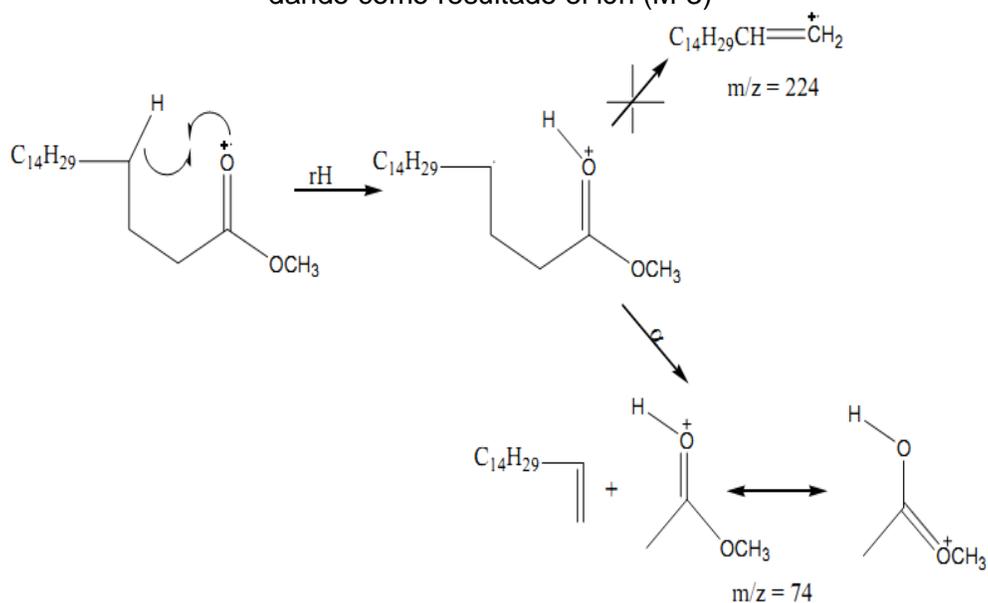


Figura 4.4. Rearreglo de McLafferty resultando el ión de masa molecular 74

En las Figuras 4.5 a 4.8 se presentan los cromatogramas de los compuestos identificados, los cuales se identificaron además de entre otros medios, con ayuda de sus tiempos de retención. Los primeros compuestos eluidos en el cromatógrafo de gases fueron los ésteres metílicos en orden ascendente de ión molecular o masa molecular y de polaridad, seguidos por el colesterol y algunos otros esteroides que no fueron identificados, siendo estos últimos, los compuestos que presentaron una mayor polaridad, lo cual era de esperarse ya que de acuerdo con las características de la columna

empleada, correspondían a una fase de DB-5MS (5% fenil-metilsilicón), la cual es una columna polar. Por otra parte, también lo que se desprende de los resultados obtenidos de la Tabla 4.4 y de los cromatogramas totales de los iones moleculares de las muestras de pescado, fue la mayor presencia de ácidos grasos saturados en lugar de monoinsaturados, dando una idea de que aunque se han tratado de conservar correctamente las muestras, éstas pudieron sufrir algún tipo de reacciones de oxidación.

Por otro lado, en las muestras de pescado, tanto frescas como ahumadas, también se encontraron restos de colesterol, mientras que en las muestras de las ollas que contenían la grasa y otros líquidos de pescado, ya no se encontraron presentes, y esto podría deberse a que la extracción fue más eficiente para compuestos menos polares, que para compuestos polares como lo es el colesterol, también puede atribuirse esto a que la detección de algún esteroide en muestras arqueológicas resulta relativamente difícil de identificar dada la baja proporción en que se encuentran (Cañabate y Sánchez, 1995). Se notó además, que en estas muestras, la extracción de compuestos de cadena mucho más larga, fue más favorable o, mejor dicho, se extrajeron compuestos con un ión molecular mucho mayor. Esto se notó también en las muestras de las ollas de barro, en las cuales fue posible identificar en una de las ollas ácido 20-metil-heneicosanoico (iso) que es un ácido graso insaturado de cadena larga. También, se detectaron altos niveles de ácidos grasos insaturados de cadena larga en el pescado lo cual era de esperarse porque son característicos de este tipo de alimentos (Malainey, 2007). Otro ácido graso detectado en las muestras de pescado y en las ollas que contenían residuos de pescado, fue el ácido palmitoleico. Este ácido no forma parte del conjunto de ácidos grasos característicos de las grasas vegetales siendo, por el contrario, propio de las de tipo animal (Cañabate y Sánchez, 1995), lo cual es congruente dado que los residuos que se encontraban en la olla eran de pescado ahumado.

En las Figuras 4.9 a 4.12 se representan los espectros de masas de los ácidos grasos más comunes y presentes en casi todas las muestras, es

decir, el éster metílico del ácido mirístico y del ácido pentadecanoico, con sus iones moleculares de 242 y 256, respectivamente, que se encuentran presentes en todas las muestras en las que se esperaba encontrar ácidos grasos. Es necesario aclarar que los demás cromatogramas y espectros de masas de los compuestos encontrados se encuentran en el Anexo "A".

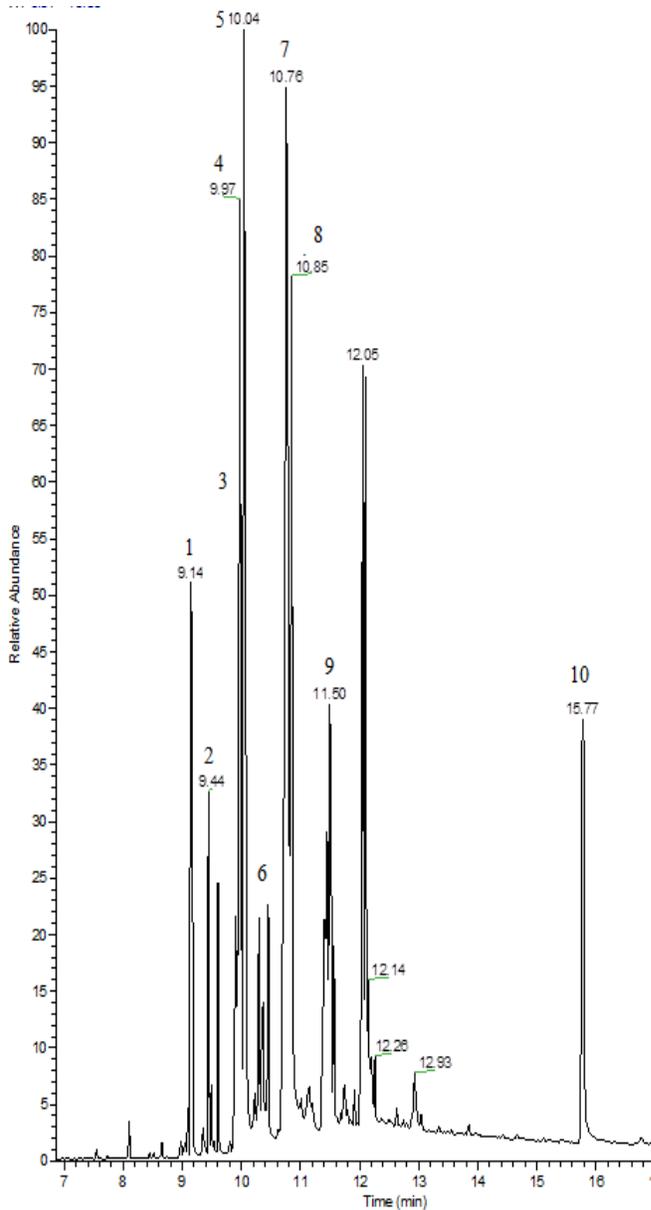


Figura 4.5. Cromatograma total de iones de la muestra 1 de pescado fresco. En donde cada uno de los números indicados del 1-10 representa un compuesto registrado en la Tabla 4.4

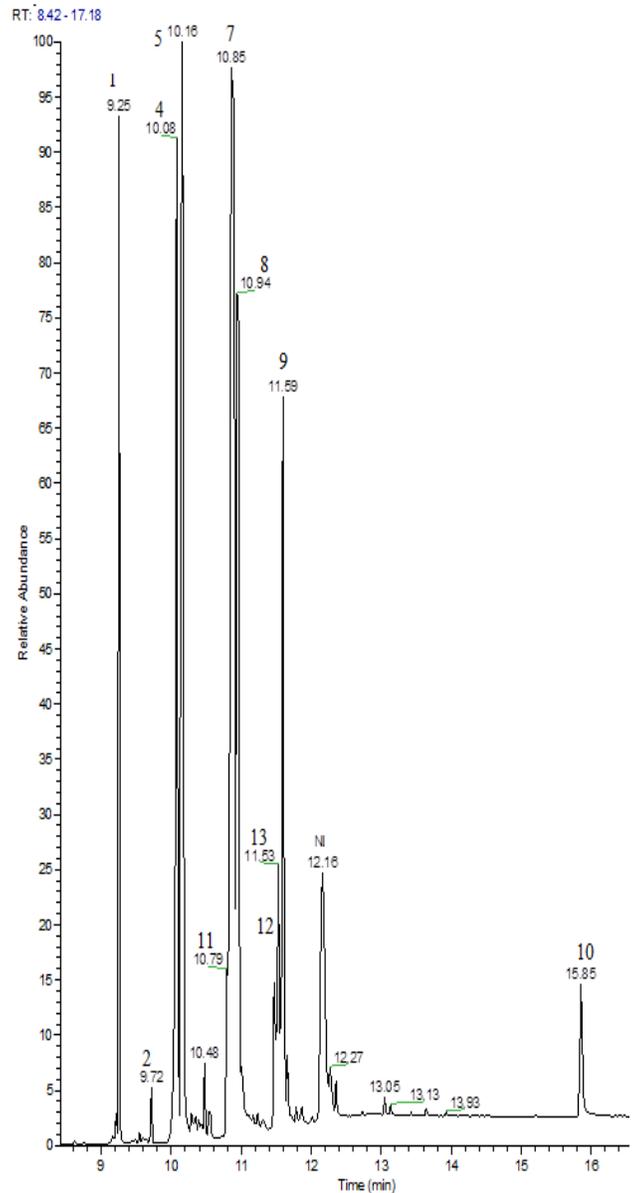


Figura 4.6. Cromatograma total de iones de muestra 2 de pescado ahumado. En donde cada uno de los números indicados del 1-10 representa un compuesto registrado en la Tabla 4.4 y NI = No identificado

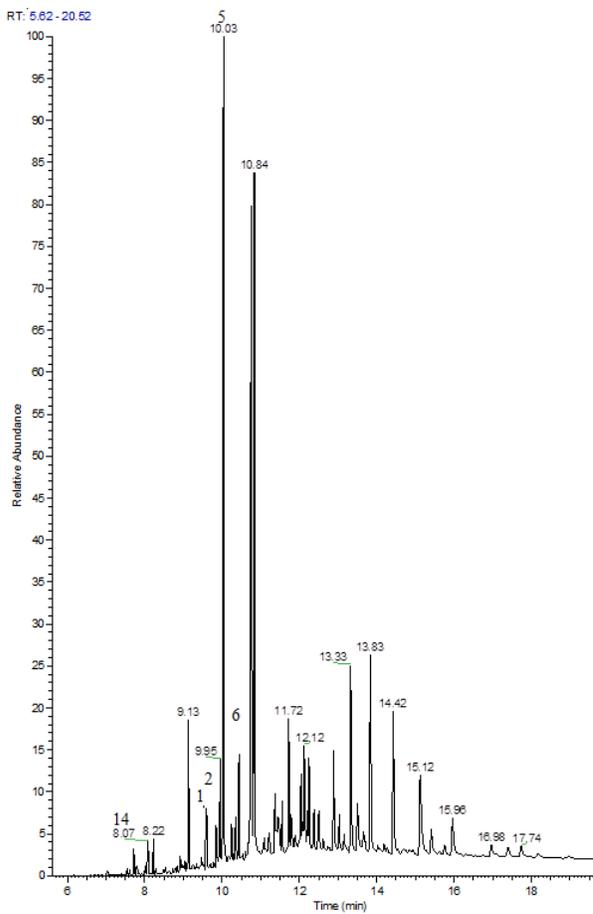


Figura 4.7. Cromatograma total de iones de la muestra 1 de la olla sin grasa (muestra control). En donde cada uno de los números indicados del representa un compuesto registrado en la Tabla 4.4

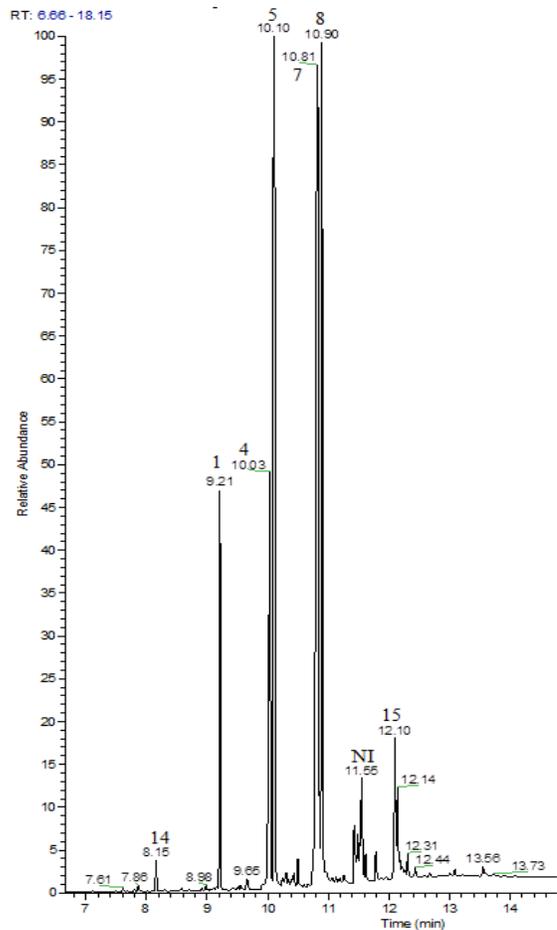


Figura 4.8. Cromatograma total de iones de la muestra 2 de la olla con grasa. En donde cada uno de los números indicados representa un compuesto registrado en la Tabla 4.4

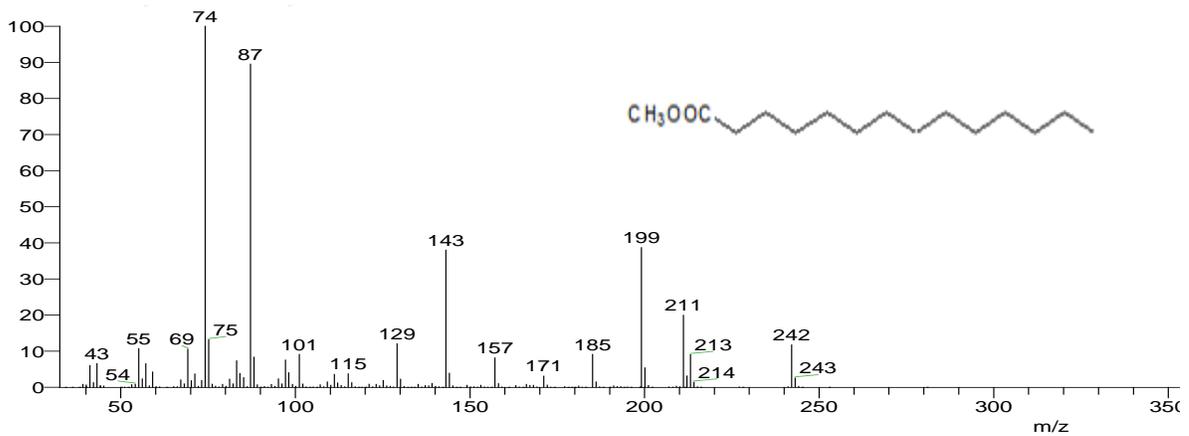


Figura 4.9. Espectro de masas obtenido mediante IE (impacto electrónico) del éster metílico del ácido mirístico con un ión molecular de $m/z = 242$

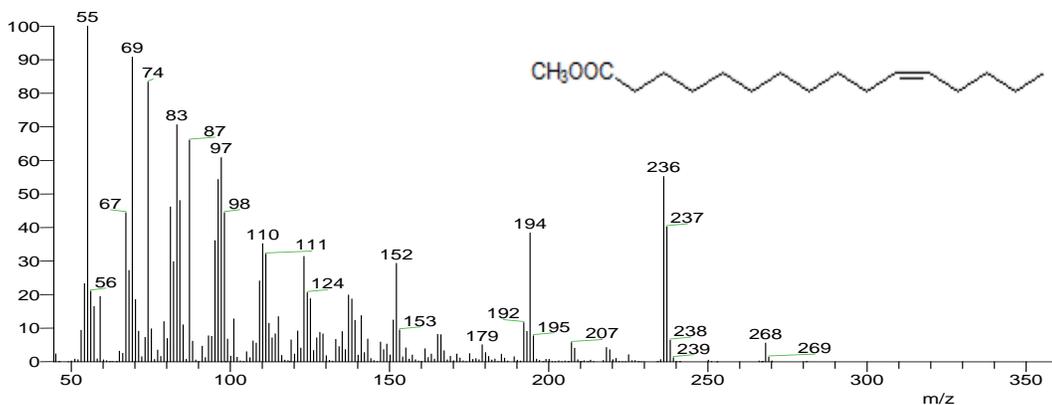


Figura 4.10. Espectro de masas obtenido mediante IE (impacto electrónico) del éster metílico del ácido palmitoleico con un ión molecular de $m/z=268$

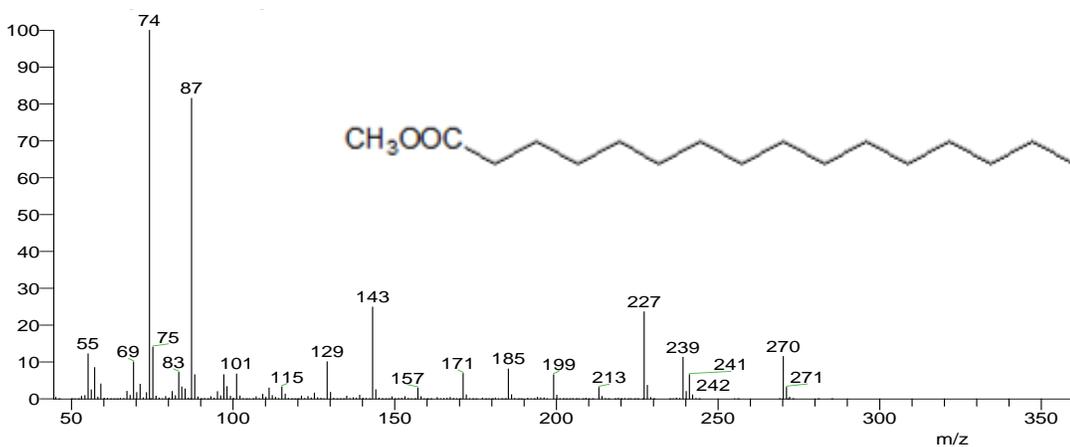


Figura 4.11. Espectro de masas obtenido mediante IE (impacto electrónico) del éster metílico del ácido palmitico con un ión molecular de $m/z=270$

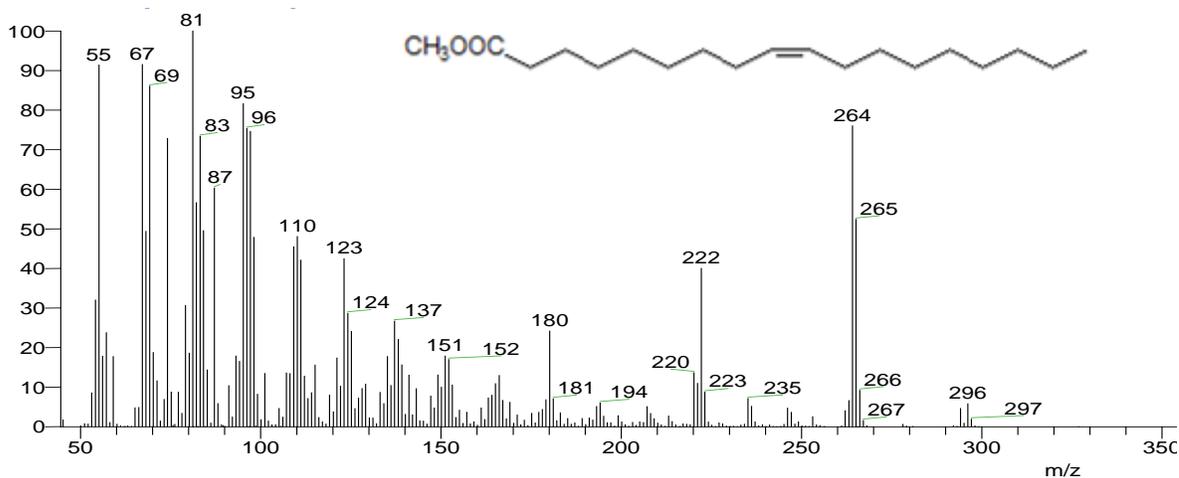


Figura 4.12. Espectro de masas obtenido mediante IE (impacto electrónico) del éster metílico del ácido oleico con un ión molecular de $m/z=296$

En la Figura 4.13 se muestra el patrón de fragmentación de un éster metílico de ácido graso, el espectro de masa del éster metílico del ácido palmítico, el cual despliega un ión molecular a una masa carga (m/z) de 270 $[M]^+$, y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes, característicos de un éster metílico de cadena lineal saturada, se observaron a m/z 270 $[M]^+$, 227 $[M - C_3H_7]^+$, 171 $[M - C_7H_{15}]^+$, 143 $[M - C_9H_{19}]^+$, 74 $[M - C_{14}H_{28}]^+$, 43 $[M - C_{15}H_{31}O]^+$. m/z 227, 185, 143, 74 (pico base) y 43.

Es necesario mencionar que los espectros de masa de los ésteres metílicos, no siempre pueden contener iones indicativos de las características estructurales clave; las posiciones de los dobles enlaces en la cadena alifática, por ejemplo, no se pueden determinar de forma inequívoca, y en lo que respecta al ión molecular M^+ que es el que proviene directamente de la molécula, normalmente se busca la señal de la masa más alta del espectro. Sin embargo, no necesariamente siempre esta señal es indicativa de que ésta sea el ión molecular, ya que es importante tomar en consideración la regla del nitrógeno y la isotopía del carbono en este caso (Duarte y Guzmán, 2013).

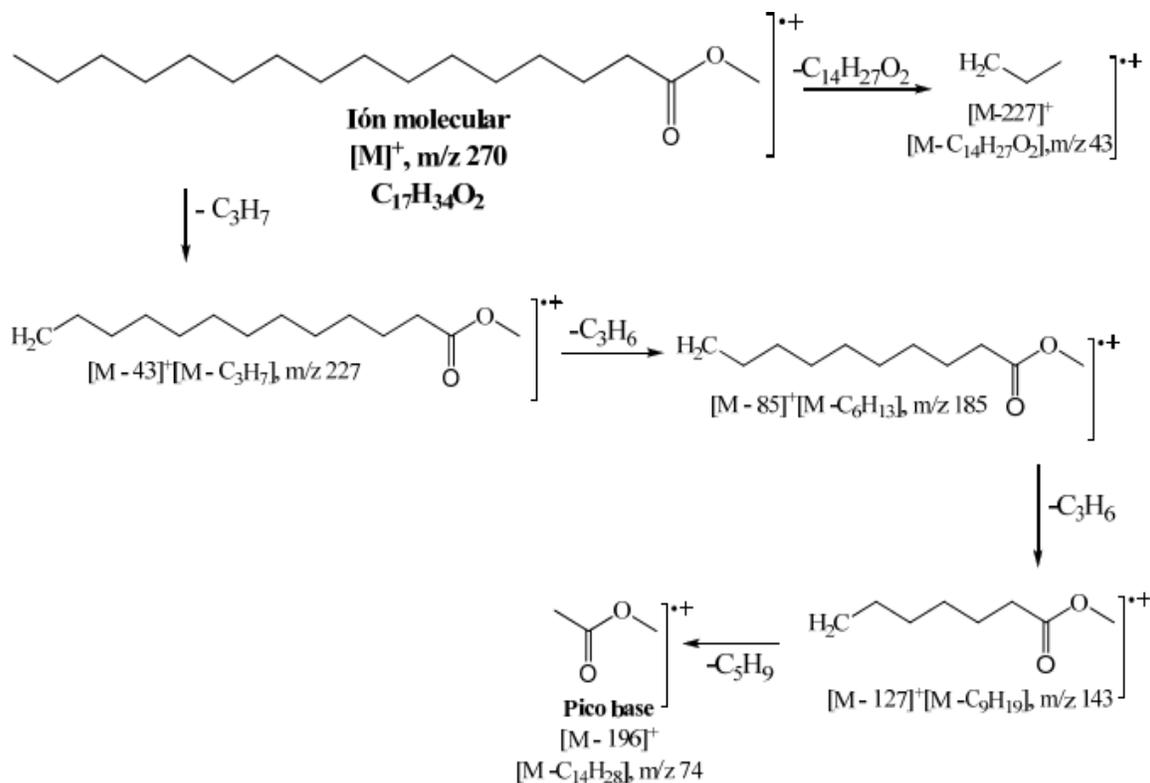


Figura 4.13. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido palmítico (Espinoza, 2010)

4.2. Resultados del experimento realizado con muestras del fragmento de fogón, pescado y armadillo

Una vez que se realizó el experimento piloto y que se obtuvieron los resultados del mismo, se procedió a realizar el experimento con muestras del fragmento del fogón, de pescado y de armadillo, y los resultados que se obtuvieron se muestran a continuación.

A) Lavado y cortado de las muestras de pescado y armadillo

En la Imagen 4.8, puede observarse la apariencia que tenía la carne de armadillo después de ser descongelada y en la Imagen 4.9, se muestra el caparazón, que tuvo que ser removido para proceder a analizar sólo la carne.



Imagen 4.8 Carne de armadillo, en la que puede apreciarse parte de un hueso y un órgano



Imagen 4.9 Carne de armadillo, en la que puede apreciarse el caparazón que se retiró

B) Secado con sal y en estufa, de las muestras de pescado y de armadillo

En la Imagen 4.10 se tiene la carne de armadillo (izquierda) y de pescado (derecha), respectivamente, antes del proceso de secado, el cual se realizó

como se describió en el apartado 3.3.2, mientras que en la Imagen 4.11 se muestra la carne de armadillo (izquierda) y de pescado (derecha), después del proceso de secado.



Imagen 4.10. Carne de armadillo y carne de pescado, antes del proceso de secado

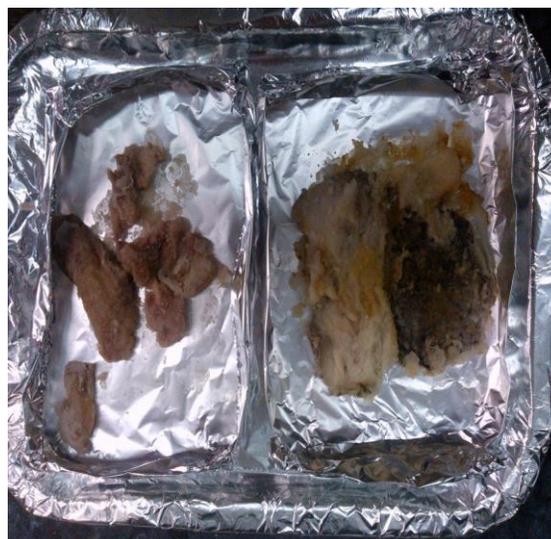


Imagen 4.11. Carne de armadillo y carne de pescado, después del proceso de secado

C) Resultados de la preparación de las muestras del fragmento de fogón, previa extracción Soxhlet

Las muestras empleadas se eligieron con base en los colores observados y tomando diferentes partes del fragmento, ya que al poseer distinta coloración y al ser de partes del fragmento, que se encontraban separadas, se esperaba ver si eso conduciría a encontrar una mayor variedad de ésteres metílicos de ácidos grasos entre las partes. En la Imagen 4.12 se observan las diferentes partes del fragmento del fogón que se eligieron para realizar los análisis.

Una vez molidas las muestras se detectaron las diferencias de coloración existentes entre las muestras, tal y como se aprecia en la Imagen 4.13.

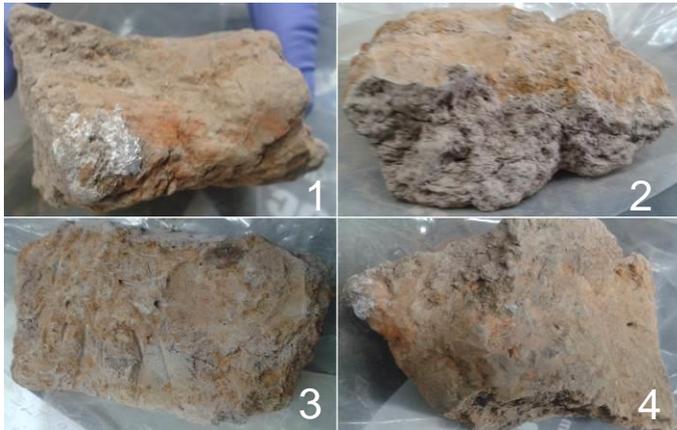


Imagen 4.12. Vista de las cuatro diferentes partes del fragmento de fogón que se eligieron para ser analizadas

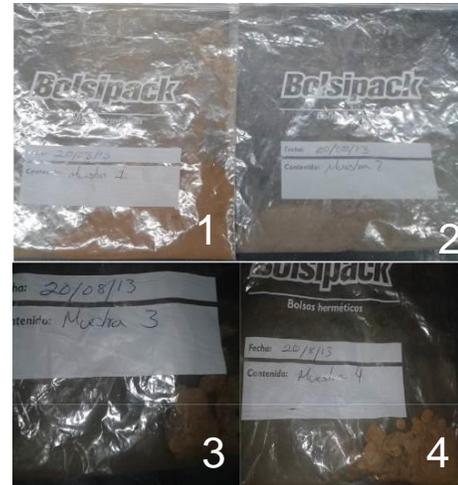


Imagen 4.13. Muestras molidas de las partes del fragmento de fogón

D) Resultados de la extracción Soxhlet, saponificación, derivatización de las muestras de pescado, armadillo y muestras del fragmento de fogón

En la Tabla 4.5. se presentan las masas de muestra y el volumen de reactivos que se emplearon para poder llevar a cabo las extracciones, así mismo, se presentan los porcentajes de grasa extraída obtenidos con esta secuencia analítica. En ella se aprecia que fue posible extraer grasa de las diferentes partes que se analizaron del fragmento del fogón, obteniéndose extracciones que van desde los porcentajes de extracción de 1.98% hasta 3.79%. Adicionalmente, los resultados de grasa extraída fueron mayores en las muestras de pescado que en las de armadillo. Al comparar los resultados de la Tabla 4.2.1. con los resultados de la Tabla 4.1.3., se observa que la cantidad de grasa de las muestras de pescado fue diferente, es decir, en la muestra control (pescado fresco) la grasa extraída fue menor que la grasa proveniente del pescado seco de la misma forma que como se secó el armadillo, lo cual nos da evidencia de que la extracción de grasa se encuentra influenciada por el tipo de secado previo que se esté realizando en las muestras (Fernández y col., 1995), siendo más efectivo, el método de secado que se realizó para las muestras de pescado y armadillo. La combinación del proceso de ahumado y liofilización resultó ser el mejor método de pre-acondicionamiento o de secado de las muestras, ya que con

éste, se logró recuperar un mayor porcentaje de grasa, siendo el porcentaje de grasa extraída en éste método, entre un 19.2 y un 23.4%. Los porcentajes de grasa extraída en las muestras de pescado salado y secado en la estufa fueron mayores (entre 2.96 y 2.85%) que en las muestras de pescado fresco liofilizado (entre 4.1 y 5.1%), debido a que en las primeras muestras (pescado salado y secado), se llevaron a cabo dos métodos de secado (salado y secado en estufa), mientras que en el pescado fresco liofilizado, sólo se realizó un método (la liofilización).

Tabla 4.5. Datos para realizar la extracción de muestras de fogón, de carne de pescado y de armadillo, así como para posteriormente realizar su saponificación y derivatización

Muestra		Masa de muestra (g)	Volumen de éter de petróleo (mL)* o de Cloroformo-metanol 2:1	Masa de grasa (g)	% Grasa extraída	Volumen de NaOH 0.5N en metanol (mL)	Volumen de HCl 5% en metanol (mL)
Fogón (Muestra 1)	1	200	2.70	0.10	3.79	4	5
	2	200	2.89	0.06	1.98	4	5
Fogón (Muestra 2)	1	250	2.97	0.04	1.24	4	5
	2	175	2.49	0.06	2.30	4	5
Fogón (Muestra 3)	1	150	2.52	0.07	2.76	4	5
	2	150	2.52	0.07	2.74	4	5
Fogón (Muestra 4)	1	200	2.51	0.06	2.46	4	5
	2	125	2.52	0.08	2.86	4	5
Pescado	1	175	2.96	0.03	2.96	4	5
	2	160	3.23	0.03	2.85	4	5
Armadillo	1	285	3.92	0.09	2.22	4	5
	2	125	4.00	0.03	0.81	4	5

*El volumen del disolvente (éter de petróleo o cloroformo:metanol) depende del tamaño, del equipo extractor y la cantidad agregada debe ser suficiente para al menos realizar una descarga del mismo

Realizando una comparación entre las muestras de ollas con residuos (propuestas en el laboratorio) y las muestras del fragmento de fogón, fue posible notar que en las muestras del fragmento de fogón, se obtuvieron porcentajes mayores de grasa extraída, (porcentajes que van desde 1.24% hasta 3.79%) y entre 1.66% y 1.71% en las muestras de ollas con residuos, dándonos una idea de la buena conservación del material lipídico presente en el fragmento a pesar de la serie de reacciones a los que

podieron estar sometidos. También, es posible observar en la Tabla 4.5., las cantidades de reactivos empleados para poder llevar a cabo la saponificación y derivatización de las muestras, de acuerdo a los porcentajes de grasa que fue posible extraer.

E) Obtención, aislamiento y determinación de ésteres metílicos empleando CG-EM de las muestras de pescado, armadillo y muestras del fragmento de fogón

Para la determinación de los ésteres metílicos empleando CG-EM se transformaron los ácidos grasos en sus derivados metil ésteres. En la Tabla 4.6. se presentan los compuestos identificados. De todos ellos, el ácido que se encontró en mayor porcentaje en el fogón fue el ácido palmítico (45.13%), seguido del ácido esteárico (26.52%) y por un isómero del ácido oleico (11.46%). En el pescado, el ácido que se encontró en mayor abundancia fue uno de los isómeros del ácido oleico (29.93%), seguido del ácido palmítico (29.20%). En el armadillo, el ácido graso más abundante fue uno de los isómeros del ácido oleico (25.54%), seguido del ácido esteárico (15.06%). En común de las muestras del fogón, de las del pescado y de las del armadillo, los ácidos grasos encontrados fueron el ácido mirístico, el ácido pentadecanoico, el ácido palmitoleico, el ácido palmítico, el ácido margárico, isómeros del ácido oleico, ácido esteárico, ácido araquídico y, finalmente, el ácido behénico. Por otro lado, sólo en las muestras de pescado se pudo detectar la presencia de ácidos grasos polinsaturados. Otra observación importante derivada de los resultados de la Tabla 4.6., fue la mayor presencia de ácidos grasos saturados en lugar de insaturados, dando una idea de que estos compuestos pudieron sufrir algún tipo de degradación, bacteriana y/o química (pirolisis y/u oxidación) lo que ocasiona que la identificación de los residuos de una fuente en específica sea más complicada. Por ello, durante años, arqueólogos y otros científicos han empleado dos métodos de interpretación de resultados de residuos; el primero de ellos utiliza proporciones de ácidos grasos. El segundo método, utiliza biomarcadores, que son compuestos únicos para un recurso o grupo

de recursos en particular, como el colesterol en la carne, los fitoesteroles en las plantas, o ciertos terpenos en resinas (Reber y Evershed, 2004). Cabe mencionar que en esta investigación, se esperaba encontrar en el fragmento de fogón, la presencia de colesterol, ya que sería de gran utilidad para conocer si los alimentos de consumo eran de origen animal. Sin embargo, no fue posible identificarlo, así como tampoco fue posible identificarlo en las ollas (experimento piloto) que se propusieron en el laboratorio, debido a las razones que ya se han mencionado anteriormente en este trabajo (resultados del inciso 4.1.2.).

Así que dado que no se encontró la presencia de algún biomarcador se recurrió a emplear el primer método, el cual usa la relación aproximada de los ácidos palmítico (C16:0): por ser de los ácidos grasos saturados más comunes, que tienden a ser más abundantes en las plantas y el pescado que en los animales y esteárico (C18:0), otro ácido graso saturado común, por ser más abundante en las grasas animales que en los lípidos de plantas y peces. De acuerdo con Reber y Evershed (2006), se explica que una proporción de C16:0/C18:0 mayor que 1 tiende a indicar que los residuos provienen de una fuente vegetal, aunque esto es una interpretación provisional y no se debe dar demasiado peso sin la corroboración de abundantes ácidos grasos insaturados o de biomarcadores relevantes.

A la inversa, una proporción de C16:0/C18:0 menor que 1 puede indicar que los residuos provienen de una fuente animal, especialmente cuando hay pocos ácidos grasos insaturados presentes (Reber y Evershed, 2006).

Tabla 4.6. Resumen de los compuestos determinados en muestras de fogón, pescado fresco (*Oreochromis sp.*) y armadillo congelado (*Dasyus novemcinctus*), por CG-EM

	Nombre del éster metílico	Masa molecular del éster metílico	Nombre trivial del ácido graso	Fogón Promedio (%)	Pescado Promedio (%)	Armadillo (%)
1	Metil tridecanoato	228		4.019	---	---
2	Metil tetradecanoato (14:00)	242	Ácido mirístico	2.115	4.582	0.646
3	Metil pentadecanoato (15:00)	256	Ácido pentadecanoico	2.714	1.500	0.525
4	12-metil-tetradecanoato	256	---	1.960	0.418	---
5	Metil 7,10-hexadecadienoato	266	---	---	0.567	---
6	Metil 11-hexadecenoato (9-16:1)	268	Ácido palmitoleico	8.060	12.148	0.532
7	NI	270	---	0.692	---	---
8	Metil hexadecanoato (16:00)	270	Ácido palmítico	42.129	29.200	9.174
9	NI	284	---	---	---	0.172
10	NI	284	---	3.094	0.936	0.199
11	Metil heptadecanoato (17:00)	284	Ácido margárico	1.774	0.799	0.462
12	Metil 9,12-octadecadienoato (18:2 (n-6))	294	---	---	---	2.228
13	Metil x-octadecenoato (x-18:1)	296	---	4.291	18.183	4.833
14	Metil x-octadecenoato (x-18:1)	296	---	11.460	19.708	25.54
15	Metil x-octadecenoato (x-18:1)	296	---	---	6.888	---
16	Metil x-octadecenoato (x-18:1)	296	---	---	29.933	14.857
17	Metil octadecanoato (18:00)	298	Ácido estéarico	26.513	4.266	15.062
18	Éster metílico del ácido ciclopropanopentanoico, 2-undecilo	310	---	1.193	---	---
19	Metil nonadecanoato (19:00)	312	Ácido nonasílico	0.253	0.161	---
20	Metil éster del ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	316	Ácido eicosapentanoico	---	0.380	---
21	Metil éster del ácido 11,14,17-eicosatrienoico	320	---	---	1.051	---
22	Metil 5-eicosenoato (5-20:1)	324	---	---	---	0.191
23	Metil eicosanoato (20:00)	326	Ácido araquídico	3.253	0.214	0.266
24	NI	342	---	---	0.045	---
25	NI	348	---	---	0.064	---
26	Metil 13-docosenoato (13-22:1)	352	---	0.540	---	---
27	Metil docosanoato (22:00)	354	Ácido behénico	2.174	0.090	0.0611
28	NI	356	---	---	0.198	---
29	Metil tricosanoato (23:00)	368	Ácido tricosílico	0.602	0.053	---
30	Metil tetracosanoato (24:00)	382	Ácido lignocérico	3.109	0.035	---
31	Metil pentacosanoato (25:00)	396	---	0.251	---	---
32	Metil hexacosanoato (26:00)	410	Ácido cerótico	1.393	---	---
33	Metil octacosanoato (28:00)	438	Ácido montánico	5.033	---	---
34	Metil triacontanoato (30:00)	466	---	0.041	---	---

*NI = No identificado; ---, no hay información; los compuestos se identificaron con ayuda del software del equipo (ChromaTOF) y con la biblioteca virtual disponible en la página electrónica Mass Spectrometry of Fatty Acid Derivatives (Christie, 2013). Los tiempos de retención aproximados se encuentran en la Tabla A.1. (ver Anexo 1).

Con esto se observa que, en el fragmento del fogón, la proporción de ácido palmítico/ácido esteárico, fue mayor que 1, lo cual indica que los residuos de ácidos grasos presentes corresponden a una fuente de origen vegetal; sin embargo, la presencia de ácidos grasos insaturados es poca, por lo que se debe tener en cuenta que las proporciones de los ácidos grasos cambiaron como producto de la descomposición:

Además, se debe considerar la variedad de recursos vegetales, animales y de insectos potencialmente disponibles en la región de San Lorenzo, Ver., y las mezclas posibles de diferentes sustancias que pudieron estar presentes en la muestra.

Por lo anterior, en investigaciones como la de Malainey (2007), se han preparado y degradado muestras para conocer el grado de descomposición a largo plazo, con la finalidad de identificar una proporción de ácidos grasos estables, encontrándose que la relación de los isómeros de C18:1, ácido oleico y vaccénico, no cambian con la descomposición, por lo que es posible usar esta relación para identificar residuos en muestras arqueológicas.

En dicha investigación también fue posible determinar que los niveles de ácidos grasos de cadena media (la suma de C12:0, C14:0 y C15:0), C18:0 e isómeros de C18:1 en las muestras (Tabla 4.7), pueden ser utilizados para distinguir los residuos de muestras degradadas.

Si se observan los resultados de esta investigación (Tabla 4.6), se puede notar que estos ácidos grasos sí se encontraron presentes, lo cual indica que el fragmento de fogón sí sufrió degradaciones pudiéndose deber entre otras causas a la acción bacteriana, ya que los ácidos grasos de cadena impar tales como el C15:0, tienden a ser subproductos de este tipo de degradación (Reber y Evershed, 2006).

En general, en el trabajo de Malainey (2007) se obtuvieron criterios para la identificación de seis tipos de residuos que se han establecido experimentalmente.

Lo anterior se resume en la Tabla 4.7, la cual fue empleada también en esta investigación para poder determinar el posible origen de los residuos del fragmento de fogón.

Tabla 4.7. Criterios para la identificación de restos arqueológicos con base en los patrones experimentales de descomposición de los residuos de cocción preparados en recipientes de cerámica (Malainey, 2007)

Identificación	Cadena mediana (C 12:0 + C 14:0 + C 15:0)	Ácido esteárico (C18:0)	Ácido oleico y/o isómeros (C 18:1)
Herbívoro	≤15%	> 27.5%	≤ 15%
Herbívoro con planta o médula ósea	Bajo	> 25%	15% ≤ X ≤25%
Planta con herbívoro	≥15%	> 25%	Sin información
Castor	Bajo	Bajo	≥ 25%
Pescado o maíz	Bajo	≤ 25%	15% ≤X≤ 27.5%
Pescado o maíz con planta	≥ 15%	≤ 25%	15% ≤ X ≤ 27.5%
Planta (excepto maíz)	≥10%	≤27.5%	≤15%

Al considerar la Tabla 4.7 se llega a la misma conclusión, los residuos de ácidos grasos presentes en el fragmento de fogón, son de origen vegetal. Sin embargo, de acuerdo a ésta misma tabla, el porcentaje de los ácidos grasos de cadena media de las muestras del fogón resultaron menores a los porcentajes que se indican deben estar presentes, por lo que tampoco es posible afirmar que se trata exclusivamente de residuos de ácidos grasos de origen vegetal. Siendo de esta forma, si se toma en cuenta que la relación de los isómeros de C18:1, ácido oleico, no cambian con la descomposición (Malainey 2007), se podrá confirmar que los residuos también correspondían a muestras de origen animal, ya que se encontraron presentes isómeros de C18:1, que son comunes en las muestras de fogón, pescado y armadillo. Es importante mencionar que también fueron encontrados residuos de ácidos grasos característicos de la cera de abeja, aunque en menor porcentaje, tales como el ácido cerótico. Por último, se puede justificar que en su mayoría los residuos presentes en el fogón sean de origen vegetal y que se encuentre en mucho mayor proporción el ácido palmítico debido a que éste es uno de los ácidos grasos comunes de la palma (y del pescado) (*Arecaceae* o *Palmaceae*), que se empleaba como combustible en la preparación y preservación de los alimentos, incluyendo el secado y el ahumado, tal y como se encontró en el análisis de fitolitos (cristales de sílice que se forman en la epidermis de las plantas; esto es, son restos de células vegetales que se han mineralizado y que presentan una estructura cristalina similar a la del ópalo) que se realizó a la tierra con abundante ceniza en el interior del fragmento de fogón (Cyphers y col., 2013).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Dados los resultados arrojados en este experimento y con base en los objetivos planteados al principio de la investigación es posible concluir lo siguiente:

- Se logró establecer una metodología de determinación de ácidos grasos para materiales biológicos (muestras de pescado) y muestras arqueológicas a analizar con modificaciones a las normas mexicanas NMX-F-089-S-1978 y NMX-F-017-SCFI-2011 para utilizar reactivos menos dañinos con el ambiente y proceder con la extracción de lípidos de la muestra facilitada por el Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM.
- Se realizó la reacción de derivatización con HCl al 5% en metanol y con ello se evitó la utilización de un reactivo dañino al ambiente como es el BF_3 y que es el propuesto en la NMX-F-017-SCFI-2011 obteniéndose buenos resultados en la determinación de ésteres metílicos de las muestras propuestas. Se logró después, aplicar estos conocimientos en la determinación de ésteres metílicos de las muestras que proporcionaron los colegas del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM.
- Se identificaron 13 ácidos grasos diferentes (en forma de sus respectivos ésteres metílicos) en las ollas de barro con residuos de pescado ahumado: Láurico, mirístico, pentadecanoico, palmitoleico, palmítico, heptadecanoico, oleico, esteárico, docohexaenoico, eicosatetraenoico, 20-metil-heneicosanoico (iso), tetracosanoico, octacosanoico.
- Fue posible la identificación, en muestras de mojarra-tilapia fresca (experimento piloto), de los siguientes compuestos: 1. Éster metílico del ácido mirístico, 2. Éster metílico del ácido pentadecanoico, 3. Éster metílico del ácido 11-hexadecenoico, 4. Éster metílico del ácido palmítico, 5. Éster metílico del ácido heptadecanoico, 6. Éster metílico del ácido oleico, 7. Éster metílico del ácido esteárico, 8. Éster metílico del ácido eicosaenoico,

9. Colesterol, que estuvieron presentes en las muestras de mojarra-tilapia ahumada, además de otros como el: 10. Éster metílico del ácido linolénico, 11. Éster metílico del ácido araquidónico y 12. Éster metílico del ácido eicosadienoico.

- Solamente fueron identificados en las muestras de pescado, el ácido 7,10-hexadecadienoico, ácido eicosapentanoico y el ácido 11,14,17-eicosatrienoico, mientras que en la carne de armadillo se identificaron el 9,12-octadecadienoato (18:2 (n-6)), y el 5-eicosenoato (5-20:1).
- Se realizó la identificación en común, en las muestras del fogón, pescado y armadillo, de los ácidos grasos: mirístico, pentadecanoico, palmitoleico, palmítico, margárico, isómeros del ácido esteárico, isómeros del ácido oleico, esteárico, araquídico y behénico. El ácido palmítico y el ácido esteárico, así como algunos de los isómeros de este último fueron los ácidos grasos presentes en mayor porcentaje.
- Se determinó de acuerdo con los criterios siguientes: relación C16:0/C18:0; los porcentajes de ácido oleico e isómeros de ácido oleico citados en la literatura, que los residuos de ácidos grasos presentes en el fragmento de fogón eran en su mayoría de origen vegetal; no obstante, también se encontraron ácidos grasos de origen animal.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir estudiando las muestras de otros fragmentos del fogón con el objetivo de verificar un mayor porcentaje de ácidos grasos de origen animal
- Ya que se encontró ácido cerótico, el cual es un ácido graso característico de la cera de abeja, se plantea la posible realización de un estudio arqueológico ligado a esto.
- Debido a que en los estudios arqueológicos requieren de analizar un gran número de muestras, se recomienda estudiar las condiciones de un método de extracción más rápido que el de Soxhlet como sería la extracción por ultrasonidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEA, 2014. Cromatografía de gases con celda de combustión y espectrometría de masas de relaciones isotópicas (GC-C-IRMS), [En línea] (Actualizado al 28 de enero de 2014). Disponible en: <http://www.aea.gob.es>

ANALISYC, 2014. *Cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas cuadrupolar*, [En línea] (Actualizado al 9 de abril de 2014) Disponible en: <http://www.analisc.es/images/GCMSQ.jpg>

Anónimo, 2012. *Mapa de la zona olmeca*, [En línea] (Actualizado al 20 de enero de 2014) Disponible en: http://1.bp.blogspot.com/-2b1B5EH7yUc/UB4o8Sq_ZrI/AAAAAAAAAD20/NsbuxpTyb-o/s1600/areanuclearolmeca.jpg

Cañabate M.L. y Sánchez, A.S., 1995. Análisis de indicadores bioquímicos del contenido de recipientes arqueológicos, *Complutum*. 6:281-291.

Cañada P., 2011. Espectrometría de masas. Técnicas, [En línea] (Actualizado al 28 de enero de 2014). Disponible en: <http://www.scai.uma.es/servicios/aqcm/ems/ems.html>

Carrasco A., 2004. *Arqueología de Los Tuxtlas*, [En línea] (Actualizado al 12 de mayo de 2013). Disponible en: http://www.naya.org.ar/congreso2004/ponencias/alan_carrasco_davila1.htm

Casellas E., 2004. El contexto arqueológico de la cabeza colosal Olmeca número 7 de San Lorenzo, Veracruz, México. Tesis, Facultad Filosofía y Letras, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España.

Christie W., 2013. Mass Spectrometry of Fatty Acid Derivatives [En línea] (Actualizado el 5 de septiembre del 2013) Disponible en: <http://lipidlibrary.aocs.org/ms/masspec.html> (Actualizado al 10 de octubre del 2013).

Christie W., 1993. Preparación of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. En: W.W. Christie, ed. *XV Advances in Lipid Methodology*. Dundee: Oily Press, pp. 69-111.

Cordero J. A., 2011. *Adherencias carbonosas de fragmentos cerámicos: su origen a través del análisis de ácidos grasos en CG y CG-MS*, Centro de

Investigaciones en Antropología Filosófica y Cultural, [En línea] (Actualizado al 15 de octubre del 2013). Disponible en http://www.vconarqhist.com.ar/wp-content/media/2011/09/Cordero_Jose-Agustin.pdf.

Cyphers A., Zurita J., Lane M., 2013. *Retos y riesgos en la vida olmeca*. México: Instituto de Investigaciones Antropológicas-Universidad Nacional Autónoma de México-Petróleos Mexicanos-Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental A.C, pp.183.

DOF, 2011. Norma Oficial Mexicana NMX-F-017-SCFI-2011. Alimentos. Aceites y grasas. Determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases en columna empacada método de prueba. México. Diario Oficial de la Federación.

DOF, 1978. Norma Oficial Mexicana NMX-F-089-SCFI-1978. Determinación de extracto etéreo (método Soxhlet) en alimentos. Foodstuff-determination of ether extract (Soxhlet). México. Diario Oficial de la Federación.

Duarte G. A. y Guzmán M., 2013. Comunicación personal. Abril del 2013. Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI). Edificio B. Facultad de Química, UNAM. México, D.F México

Eerkens J.W. y Barnard, H., 2007. Introducción. En *Theory and Practice of Archaeological Residue Analysis*. *BAR internatióanal series 1650*. Eds. J.W. Eerkens y H. Barnard, Oxford, Reino Unido.Archaepress. pp. 1-7.

Espinoza O., 2010, *Análisis Fitoquímico y Bioactividad de la Planta Melochia tomentosa (STERCULIACEAE)*, Trabajo de Grado, Universidad de Oriente Núcleo de Sucre. Sucre, Venezuela. Escuela de Ciencias, Departamento de Química. pp. 47

Fernández S., Pollak A., Vitancurt J., 1995, *Pescado ahumado artesanalmente. Ensayos Tecnológicos*, PROBIDES, Instituto de Investigaciones Pesqueras, Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. pp 69.

Florescano E., 2007. Análisis de indicadores bioquímicos del contenido de recipientes arqueológicos, *Revista de la Universidad de México*. 38:5-18.

Gutiérrez M.C., Droguet, M., 2002. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes del mal olor. *Boletín Intezxter*. 12:35-41.

Last R.L., Jones, D.A. y Shachar-Hill Y., 2007. *Small-molecule analysis by mass spectrometry with chromatographic separation*. [En línea] (Actualizado al 9 de abril de 2014) Disponible en: <http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n2/images/nrm2098-f2.jpg>.

López J., 2008. *Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos*. Trabajo de grado. Pereira, Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología, Escuela de Química. 84 págs.

Malainey M.E., 2007. Fatty Acid Analysis of Archaeological Residues: Procedures and Possibilities. **En:** J.W. Eerkens y H. Barnard, eds. *Theory and Practice of Archaeological Residue Analysis*. BAR internacional series 1650. Oxford: Archaeopress, pp. 77-89.

Marrero D., 2006. Obtención y determinación de ácidos grasos de muy elevada masa molecular. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 37(1):23-33.

Maza P.A., 2006. *Los Olmecas: un Enfoque alternativo*. Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo. pp. 41.

Mirón E., 2002. Análisis de lípidos: Un estudio de arqueología experimental de residuos de maíz en cerámica de Santa Apolonia, Chimaltenango. **En:** J.P. Laporte, H. Escobedo y B. Arroyo, eds. *XV Simposio de Investigaciones Arqueológicas en Guatemala*. Guatemala: Museo Nacional de Arqueología y Etnología, pp. 446-4452.

O'Keefe S.F., 2002. Nomenclature and Classification of Lipids. **En:** C.C. Akoh y D.B. Min, eds. *Food Lipids: Chemistry, Nutritión, and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, pp. 7-46.

Passi S., Rothschild-Boros M.C., Fasella P., Nazzaro-Porr M. y Whitehouse D., 1981. An application of high performance liquid chromatography to analysis of lipids in archaeological samples. *Journal of Lipid Research*. 22:778-784.

Profeco, 2012, Pescado seco salado. [En línea] (Actualizado al 20 de agosto de 2013). Disponible en:

<http://www.profeco.gob.mx/tecnologias/pesymar/pescaseco.asp>,

RAE, 2014. Fogón, [En línea] (Actualizado al 11 de marzo de 2014). Disponible en: <http://buscon.rae.es/drae/srv/search?id=06fJWYUj3DXX2foGpOKJ>

Rasoarahona J.R.E., Barnathan G., Bianchini J-P. y Gaydou E.M., 2005. Influence of season on the lipid content and fatty acid profiles of three tilapia species (*Oreochromis niloticus*, *O. macrochir* and *Tilapia rendalli*) from Madagascar, *Food Chemistry*, 91:683-694.

Reber E., Evershed R., 2004. Identificación of, maize in absorbed organic residues: a cautionary tale. *Journal of Archaeological Science*, 31(4):399-410.

Reber E., Evershed R., 2006. Ancient vegetarians? Absorbed pottery residue analysis of diet in the Late Woodland and Emergent Mississippian periods of the Mississippi Valley. *Southeastern Archaeology*, 25(1):110-120

Romanus K., 2008. Residue analysis on organic remains in archaeological artefacts. Tesis, Leuven Bélgica: Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Katholieke Universiteit Leuven.

Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., 2001. *Fundamentos de Química Analítica. Volumen 2*. Barcelona: Reverté, pp. 1184.

Tomé E, Kodaira, M., Matsunaga, Y., 1999. Efecto de las condiciones de procesamiento, contenido de grasa y grado de frescura de la materia prima, en calidad de filetes de bagre ahumados, *Food Science and Technology Internacional, Ciencia y Tecnología Internacional*, 5(2):167-176.

Williams E., 1994. Organización del espacio doméstico y producción cerámica en Huáncito, Michoacán. **En:** E. Williams ed. *Contribuciones a la arqueología y etnohistoria del Occidente de México. Colección Memorias. Michoacán*. Michoacán: El Colegio de Michoacán A.C., pp. 189-226.

Yáñez Ma., 2003. Determinación de grasa cruda, [En línea] (Actualizado al 15 de marzo de 2014). Disponible en: http://docencia.izt.uam.mx/lyanez/analisis/material_adicional/notasgrasas.ppt

ANEXO A

Cromatogramas y espectros de masas de las muestras analizadas

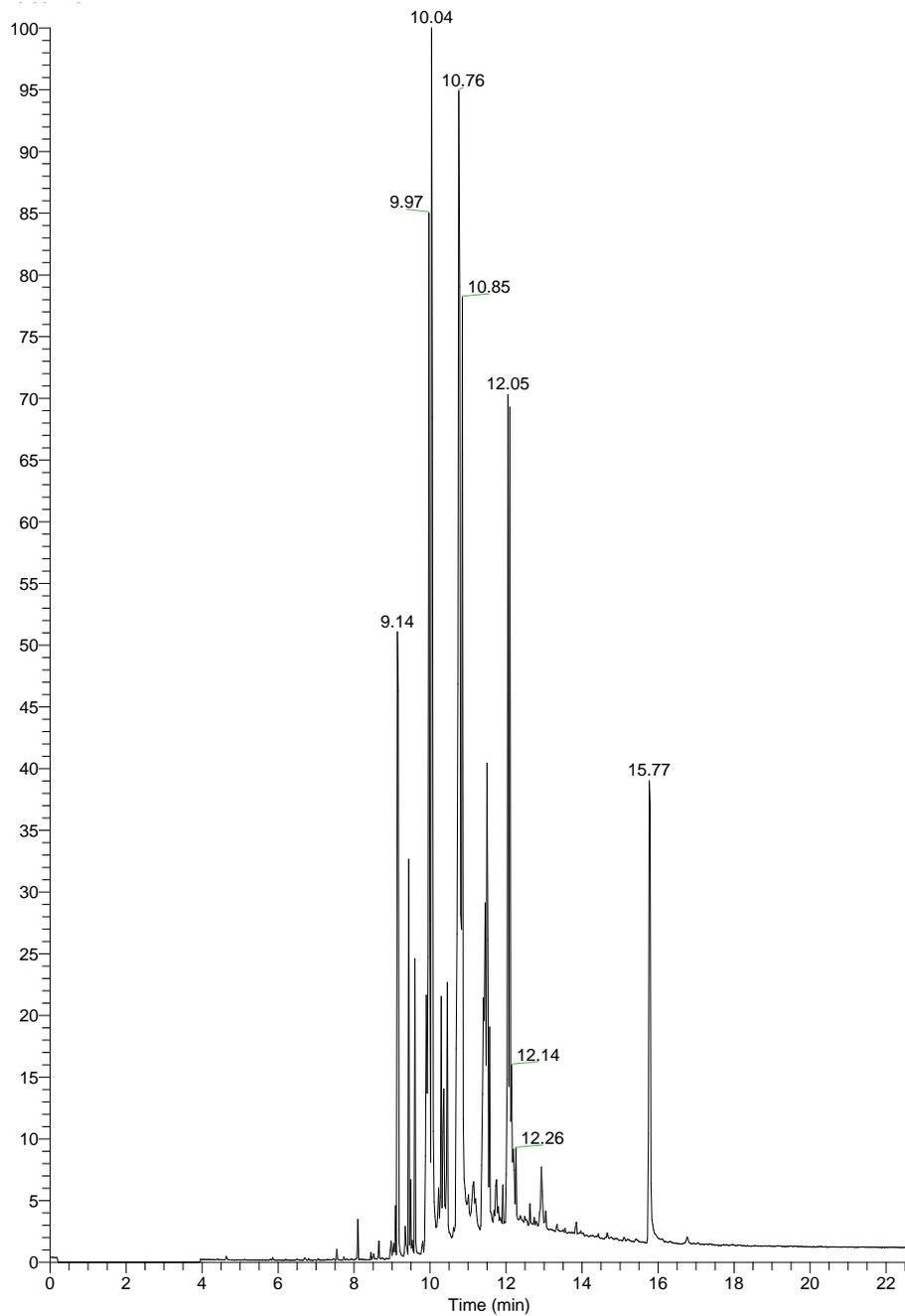


Figura A.1. Cromatograma total de iones de la muestra 1 del pescado fresco (Experimento piloto)

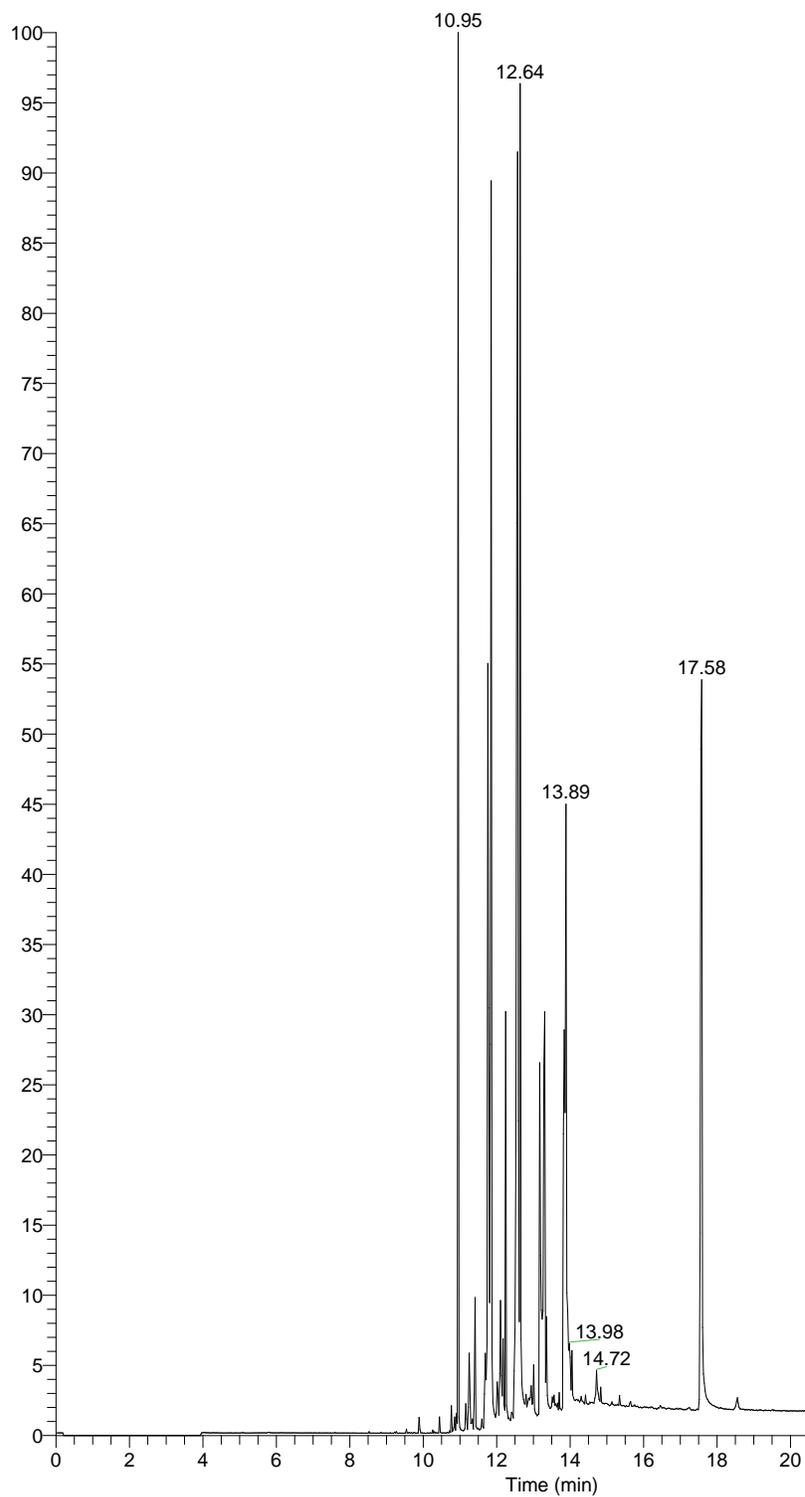


Figura A.2. Cromatograma total de iones de la muestra 2 del pescado fresco (Experimento piloto)

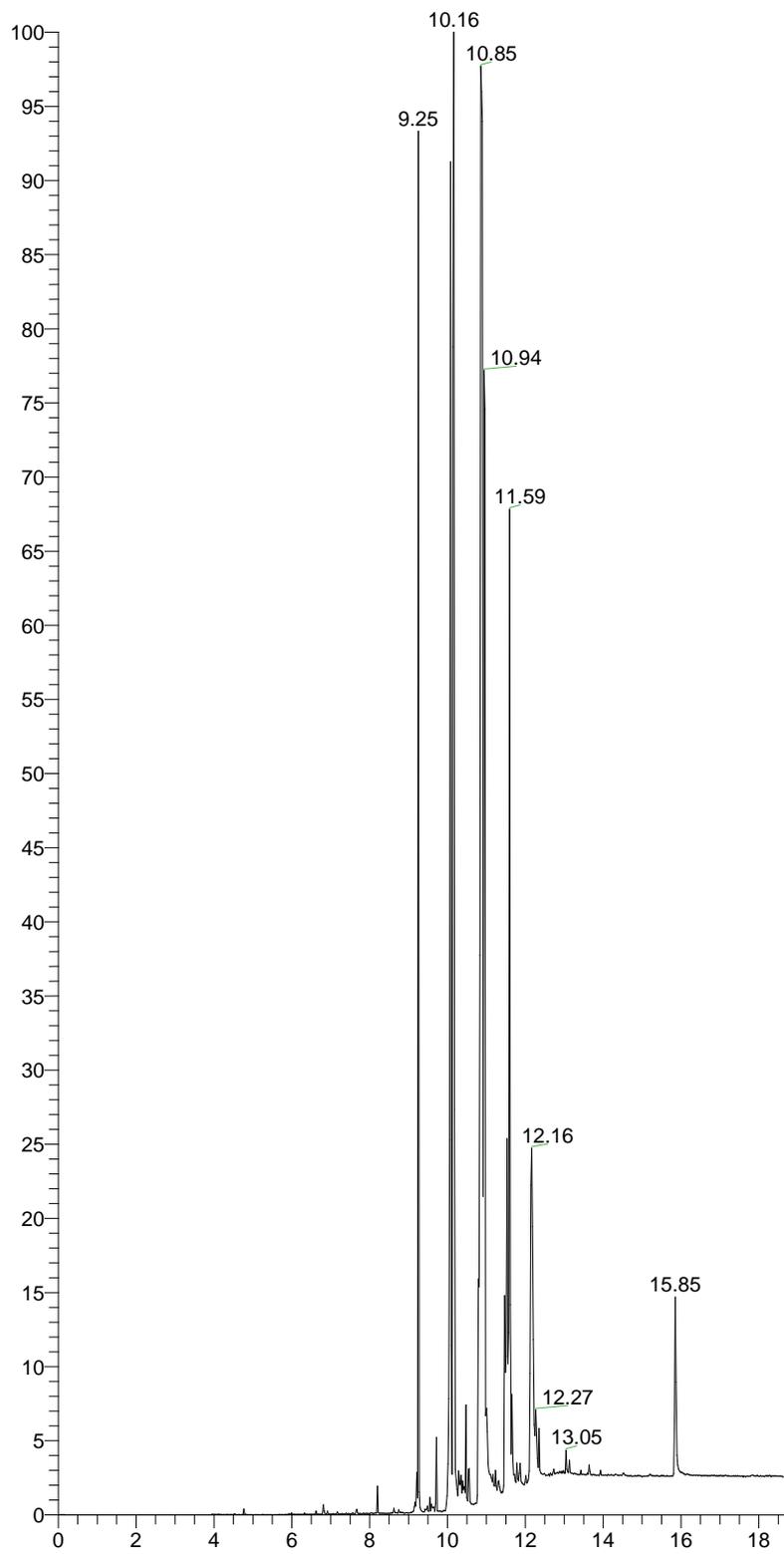


Figura A.3. Cromatograma total de iones de la muestra 1 del pescado ahumado (Experimento piloto)

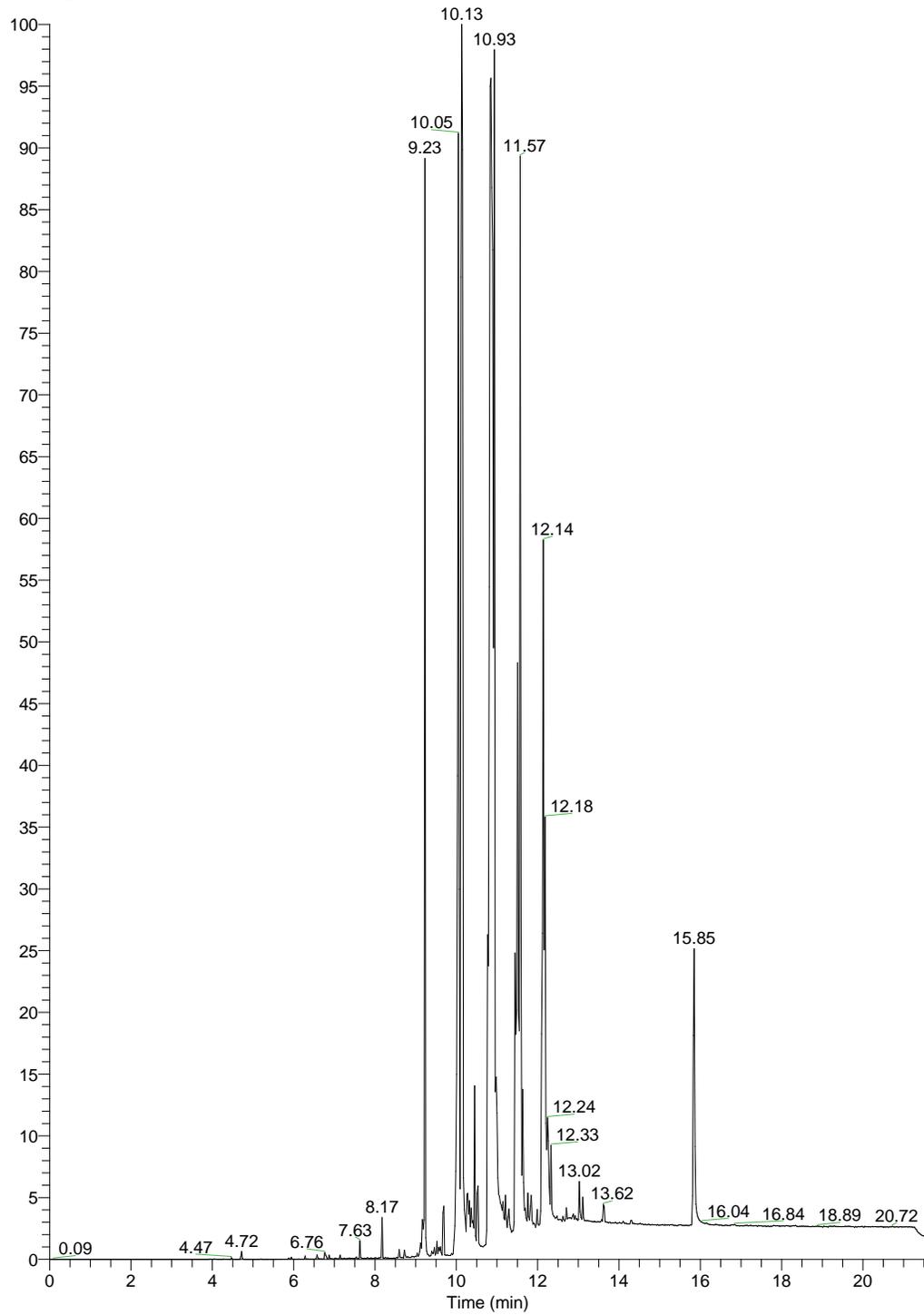


Figura A.4. Cromatograma total de iones de la muestra 2 del pescado ahumado (Experimento piloto)

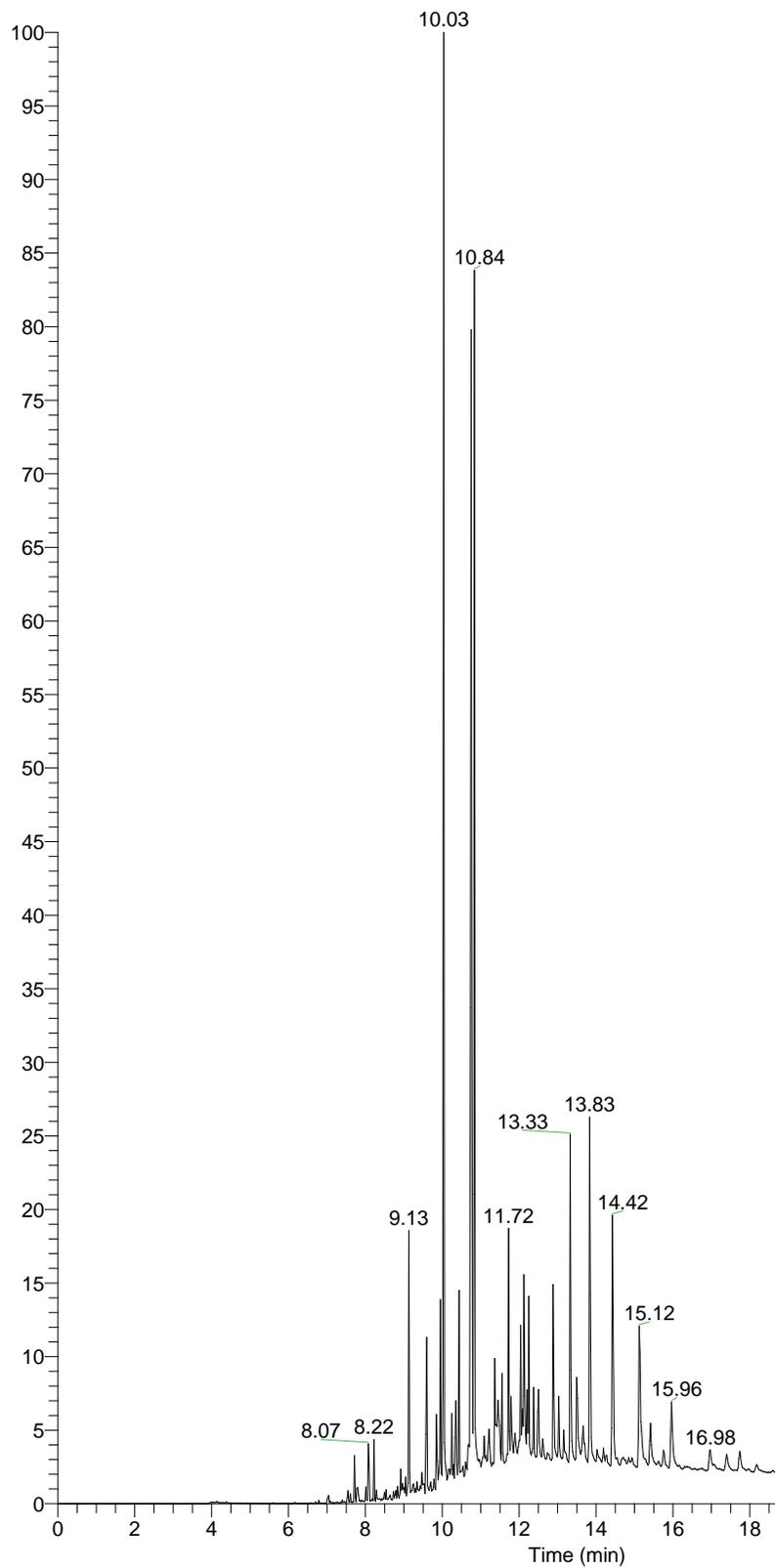


Figura A.5. Cromatograma total de iones de la muestra 1 de la olla sin grasa añadida (Experimento piloto)

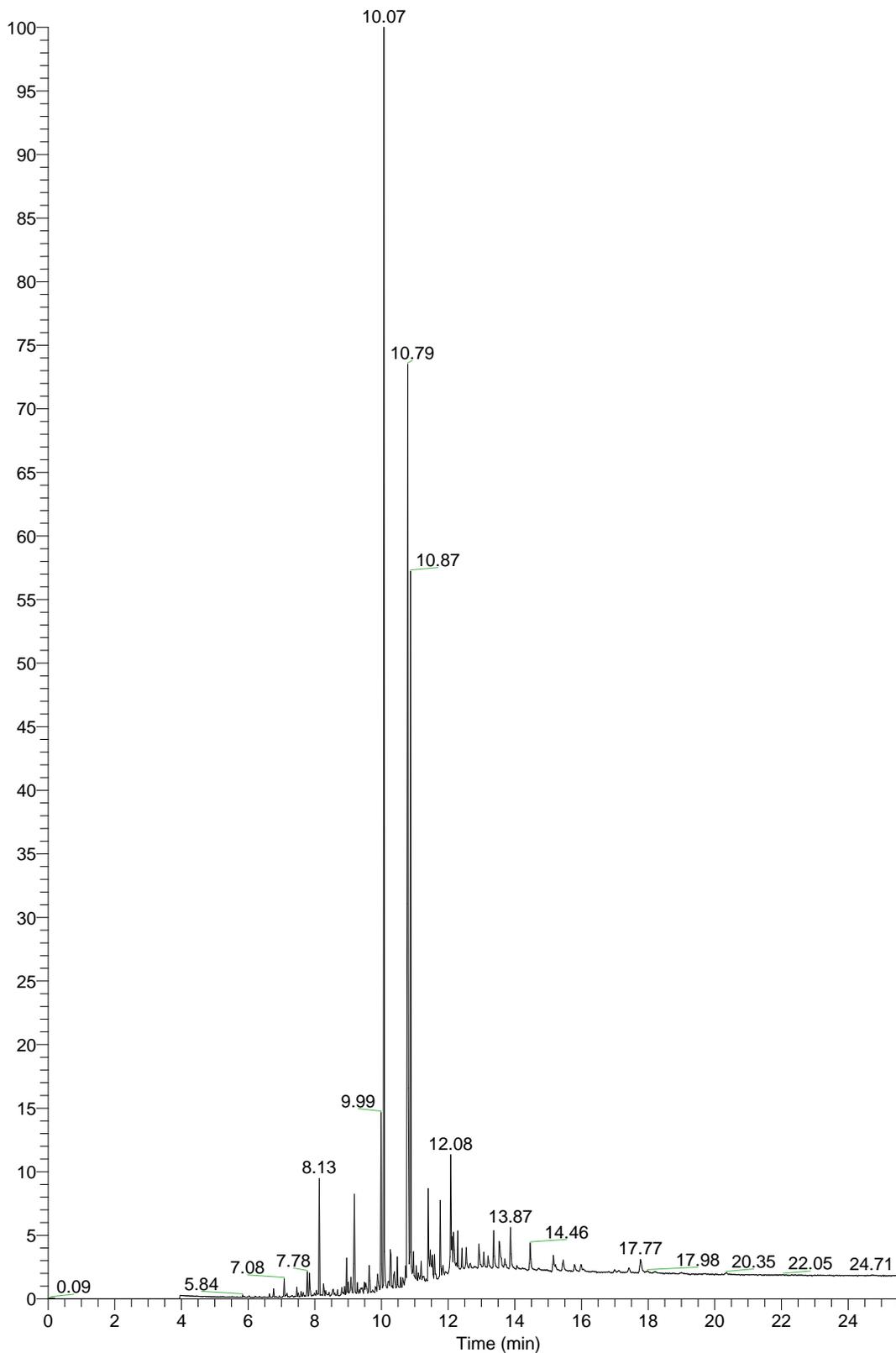


Figura A.6. Cromatograma total de iones de la muestra 2 de la olla sin grasa añadida (Experimento piloto)

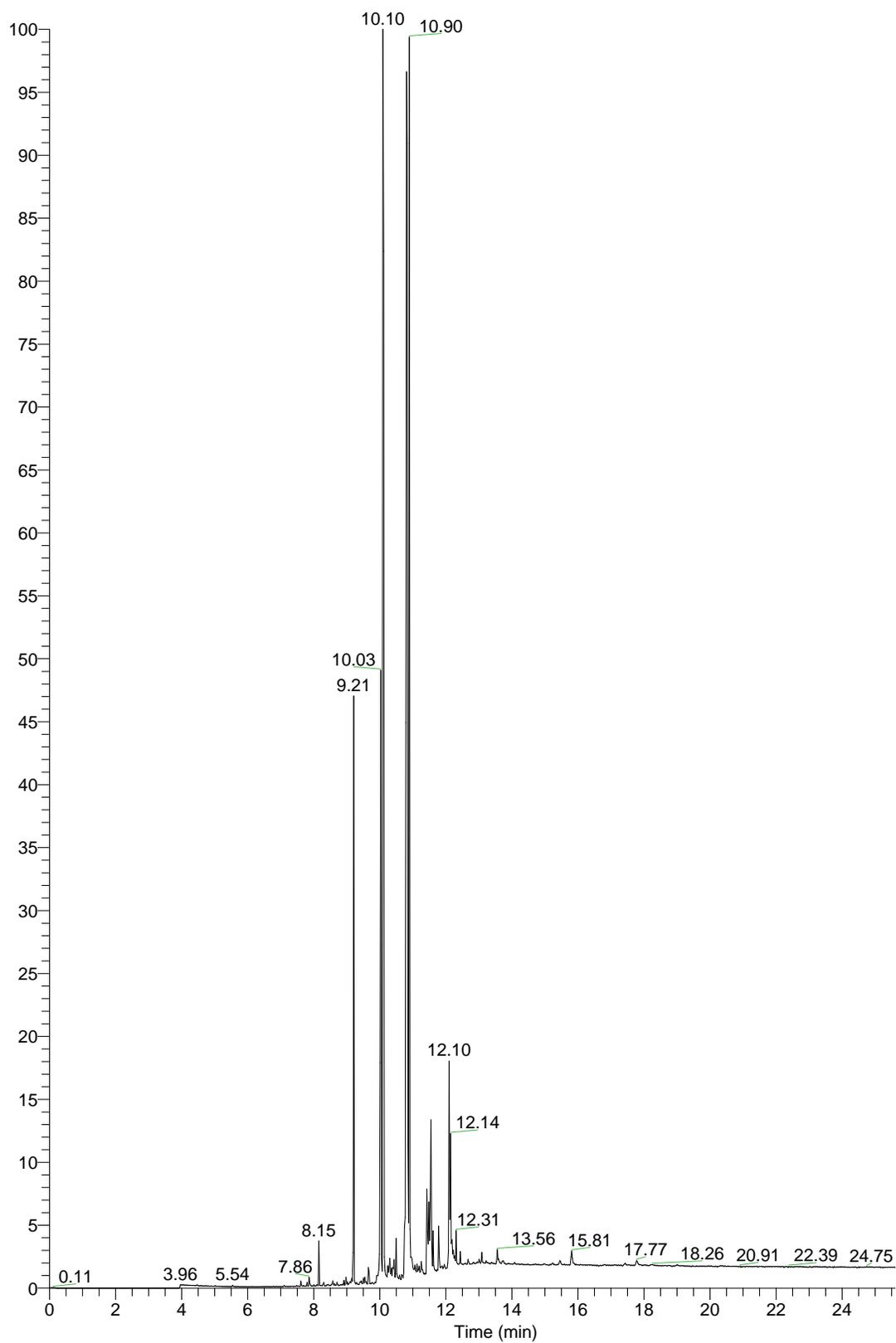


Figura A.7. Cromatograma total de iones de la muestra 1 de la olla con grasa añadida (Experimento piloto)

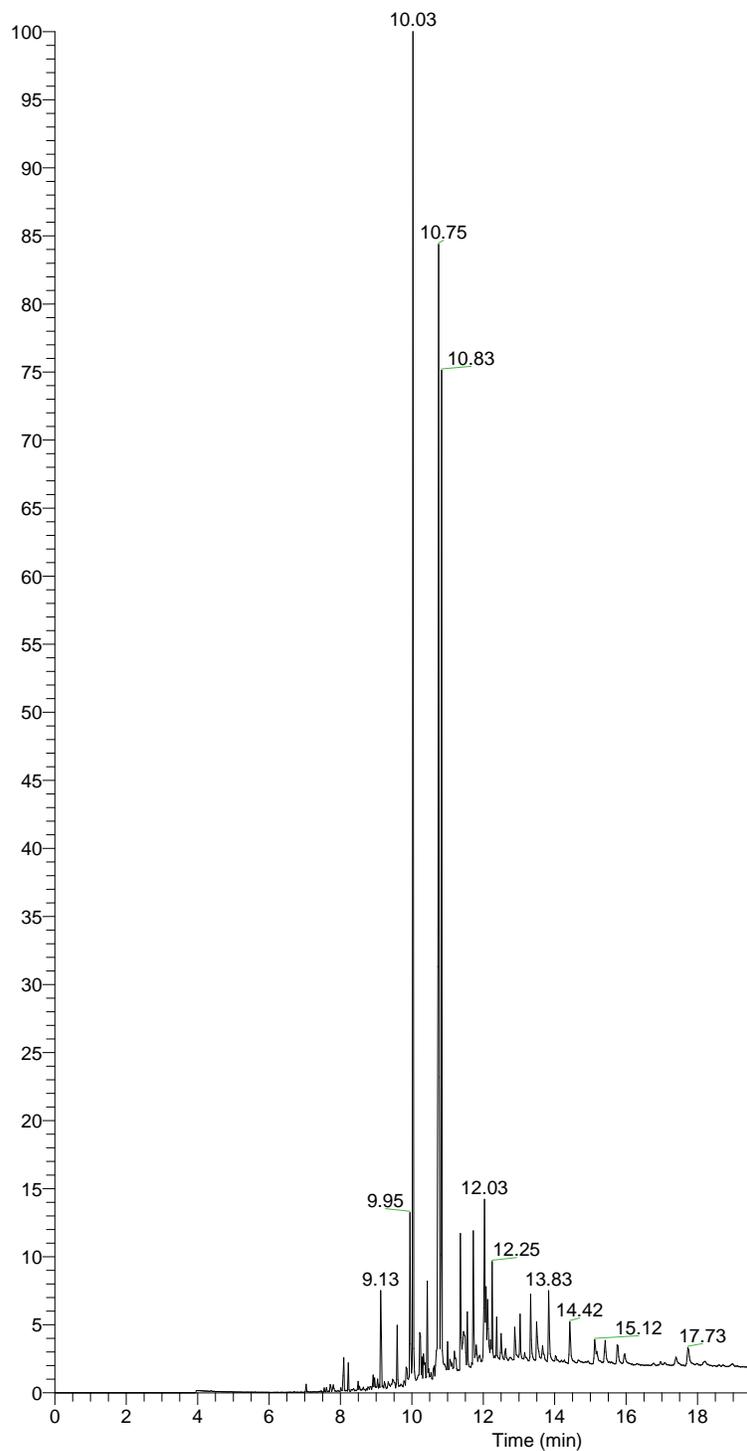


Figura A.8. Cromatograma total de iones de la muestra 2 de la olla con grasa añadida (Experimento piloto)

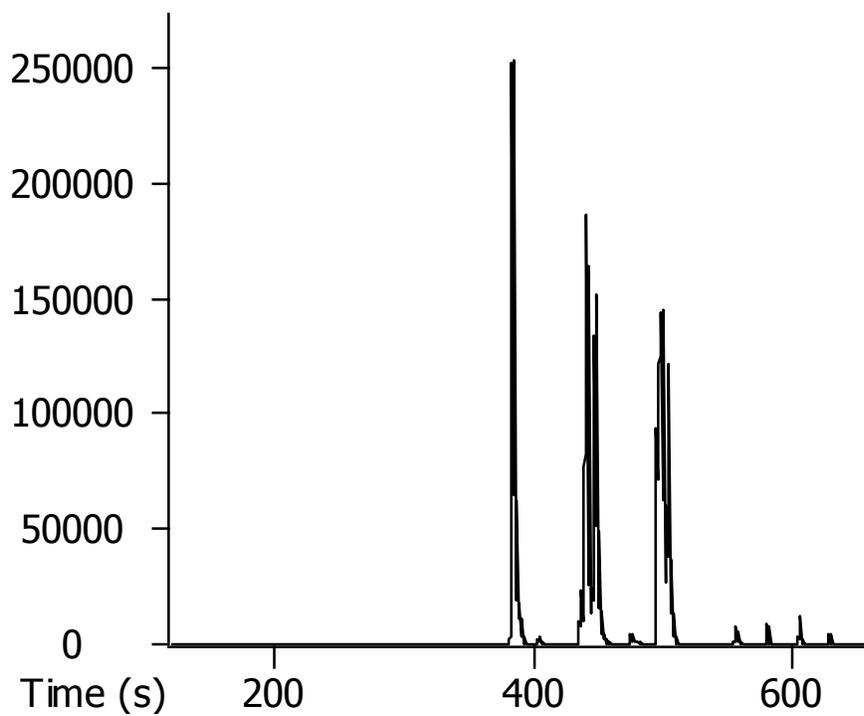


Figura A.9. Cromatograma de la muestra 1 de pescado

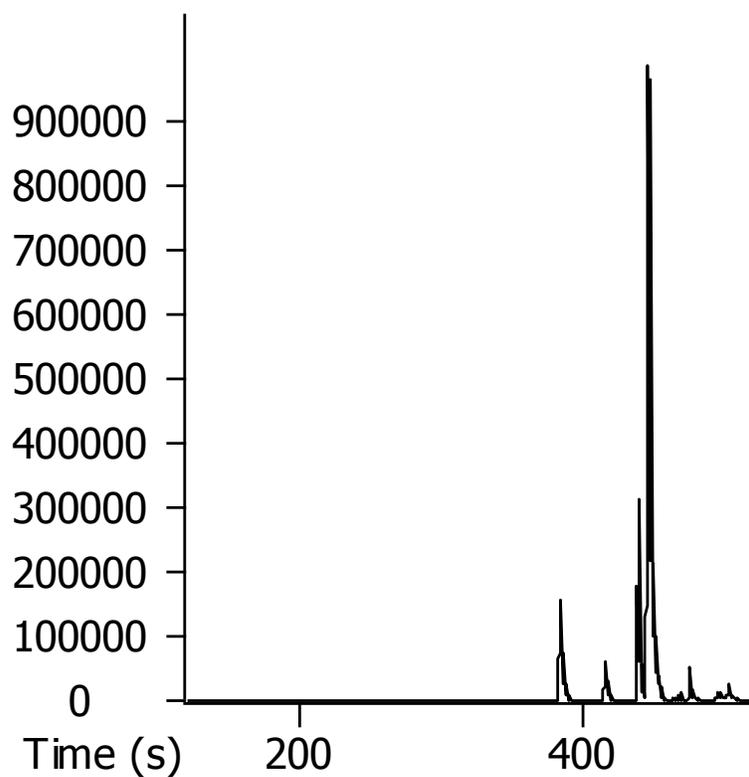


Figura A.10. Cromatograma de la muestra 2 de pescado

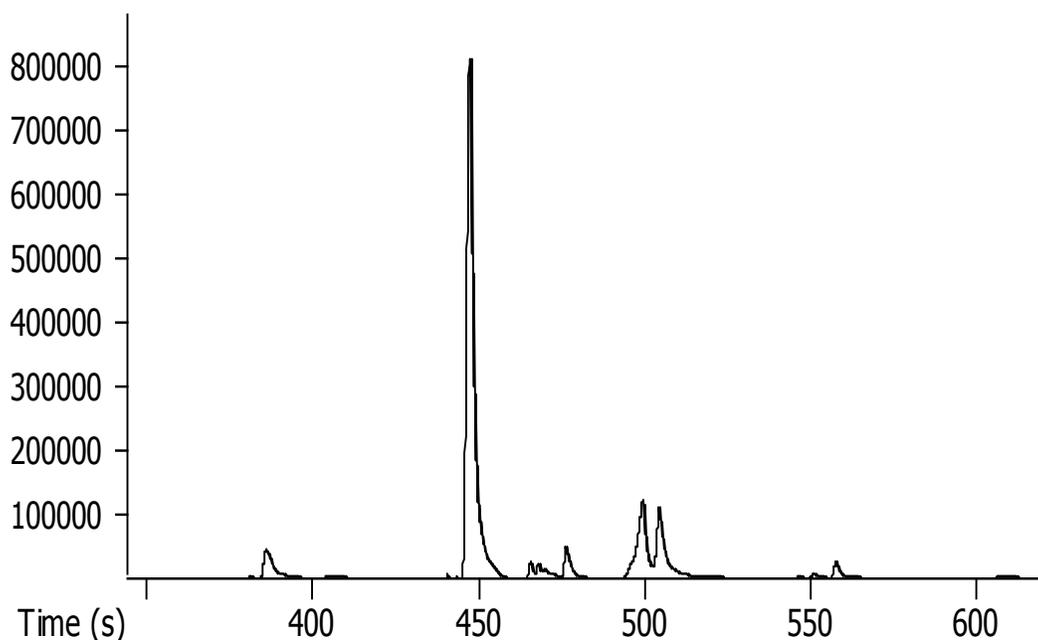


Figura A.11. Cromatograma de la muestra 1 de armadillo

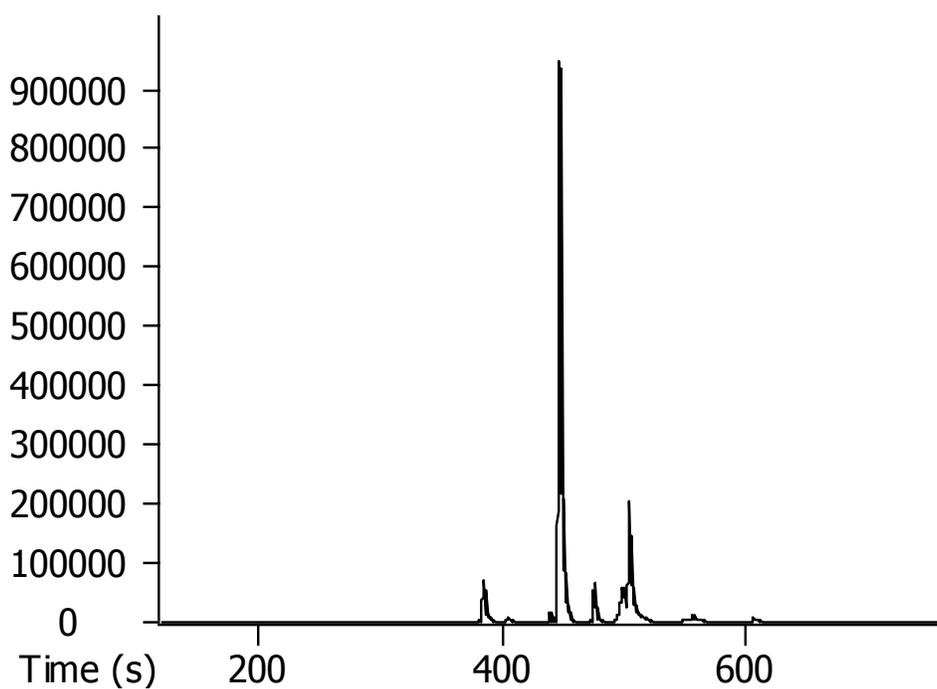


Figura A.12. Cromatograma de la muestra 2 de armadillo

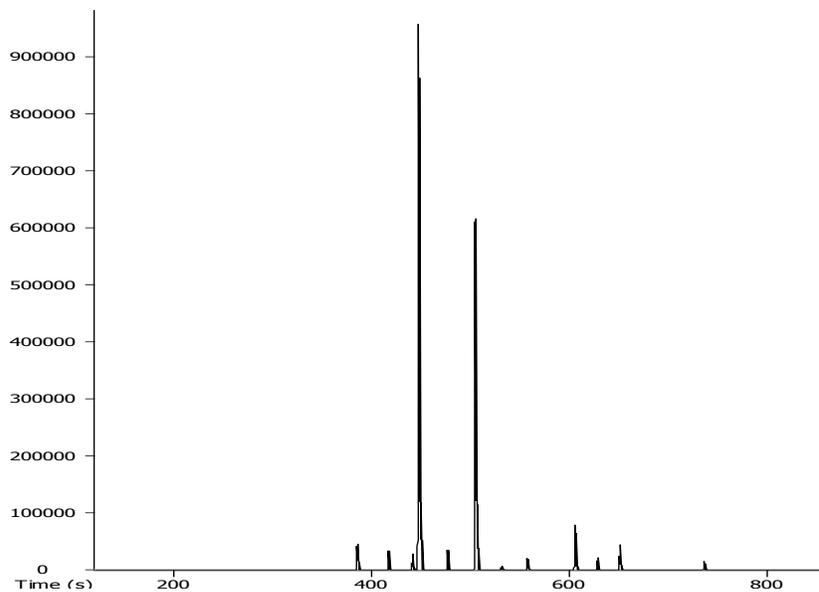


Figura A.13. Cromatograma de la muestra 1 del fragmento 1 de fogón

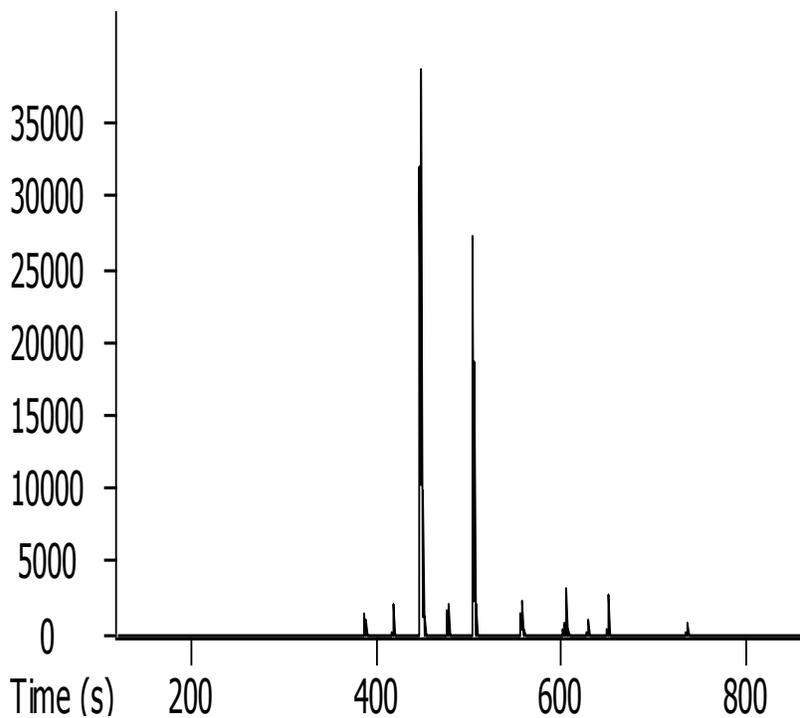


Figura A.14. Cromatograma de la muestra 2 del fragmento 1 de fogón

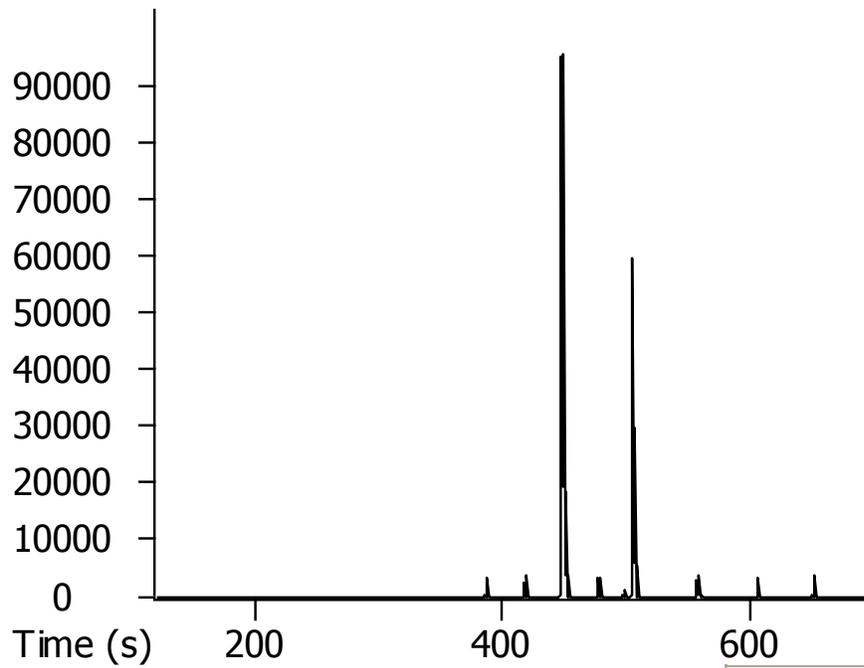


Figura A.15. Cromatograma de la muestra 1 del fragmento 2 de fogón

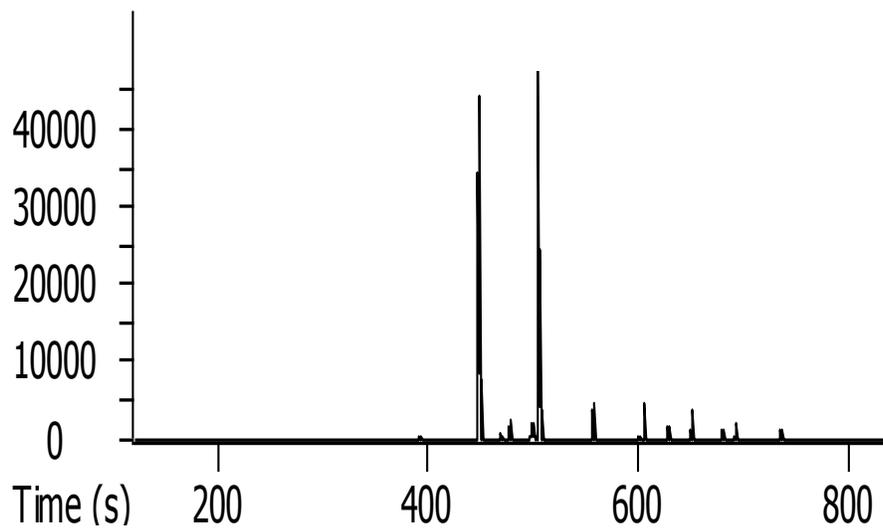


Figura A.16. Cromatograma de la muestra 2 del fragmento 2 de fogón

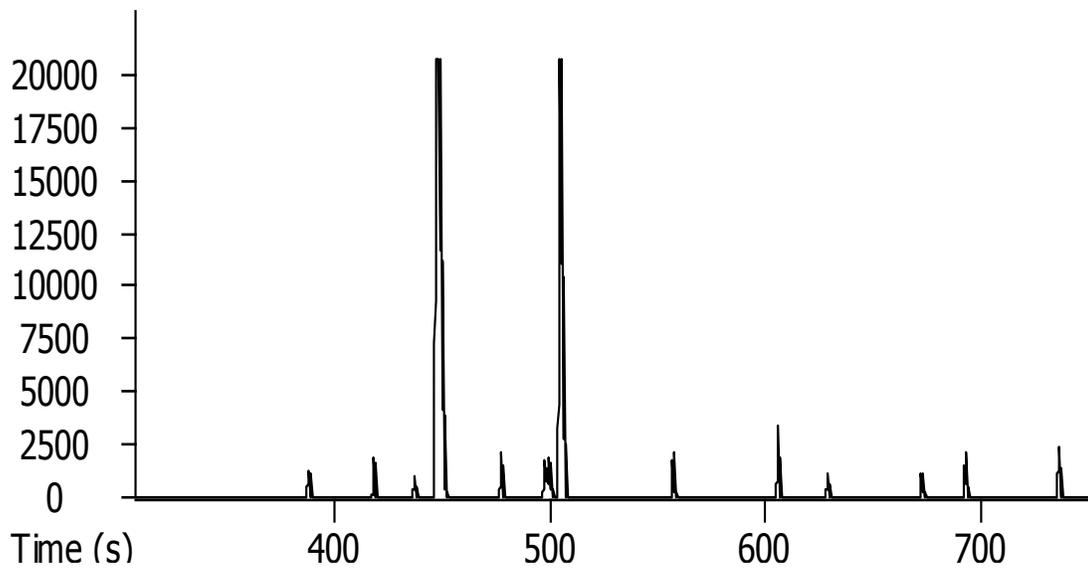


Figura A.17. Cromatograma de la muestra 1 del fragmento 3 de fogón

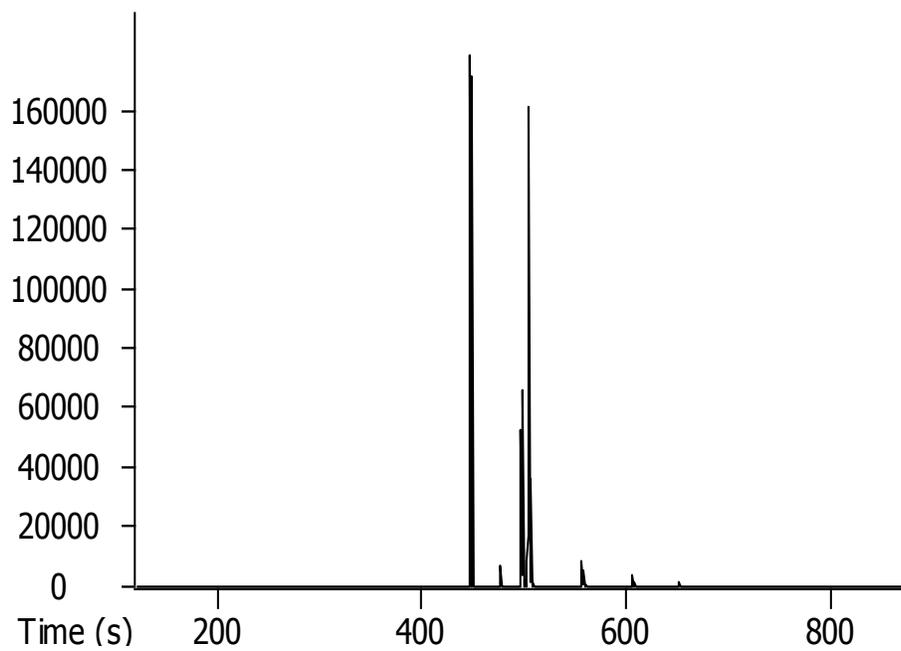


Figura A.18. Cromatograma de la muestra 2 del fragmento 3 de fogón

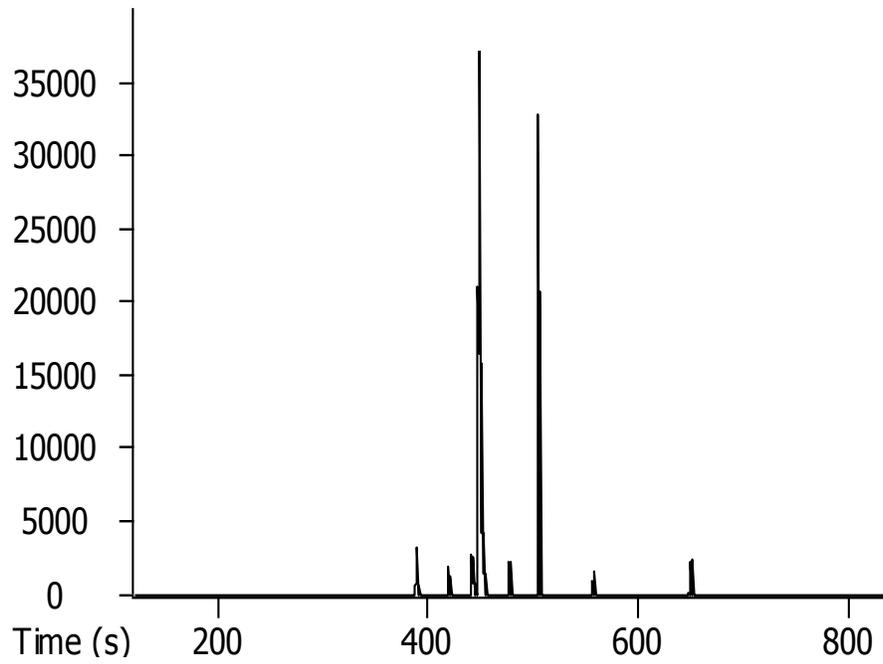


Figura A.19. Cromatograma de la muestra 1 del fragmento 4 de fogón

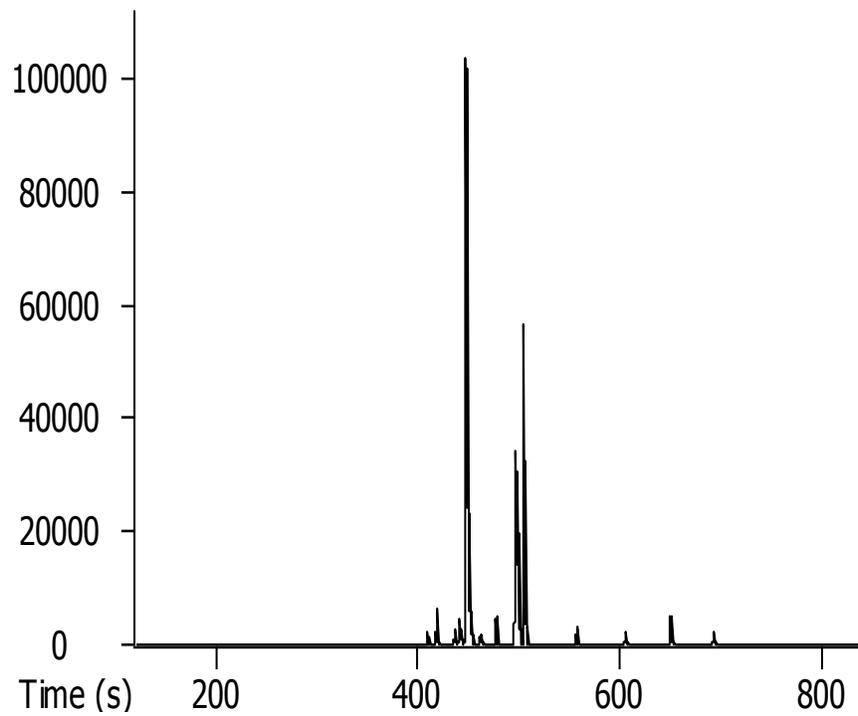


Figura A.20. Cromatograma de la muestra 2 del fragmento 4 de fogón

Tabla A.1. Tiempos de retención aproximados para cada compuesto identificado mediante CG-EM

Compuesto	Nombre trivial del ácido graso	lón molecular	Tiempo de retención (s)*
Éster metílico del ácido dodecanoico	Ácido láurico	214	322.740
Metil tridecanoato	---	228	363.736
Metil tetradecanoato (14:00)	Ácido mirístico	242	392.013
Metil pentadecanoato (15:00)	---	256	411.961
12-metil-tetradecanoato	---	256	418.897
Metil 7,10-hexadecadienoato	---	266	436.755
Metil 11-hexadecenoato (9-16:1)	Ácido palmitoleico	268	441.105
Metil hexadecanoato	Ácido palmítico	270	447.990
Metil heptadecanoato	Ácido margárico	284	474.384
Éster metílico del ácido 9,12,15 octadecatrienoico	Ácido linolénico	292	482.940
Éster metílico del ácido 9,12 octadecadienoico	Ácido linoleico	294	496.244
Éster metílico del ácido 9-octadecenoico	Ácido oleico	296	498.543
Éster metílico del ácido 10-octadecenoico	Ácido nonasílico	296	498.993
Éster metílico del ácido 11-octadecenoico	---	296	499.693
Éster metílico del ácido octadecanoico	Ácido esteárico	298	504.771
Éster metílico del ácido ciclopropanopentanoico, 2-undecilo	---	310	504.494
Metil nonadecanoato	---	312	531.539
Éster metílico del ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Ácido eicosapentaenoico	316	542.516
Éster metílico del ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenoico,	Ácido araquídico	318	547.166
Éster metílico del ácido 11,14,17-eicosatrienoico	---	320	551.816
Éster metílico del ácido eicosadienoico	---	322	554.141
Éster metílico del ácido 5-eicosenoico	---	324	556.466
Éster metílico del ácido 11-eicosenoico	---	324	557.166
Éster metílico del ácido eicosanoico	Ácido araquídico	326	557.578
Éster metílico del ácido docosahexenoico	---	342	580.743
Éster metílico del ácido 13-docosenoico	---	352	603.478
Éster metílico del ácido 20-metil-heneicosanoico (iso)	---	354	605.705
Metil docosanoato	Ácido behénico	354	606.170
Metiltricosanoato	Ácido tricostílico	368	628.493
Metil tetracosanoato	Ácido lignocérico	382	650.961
Colesterol	---	386	678.140
Metil pentacosanoato	---	396	680.363
Metil hexacosanoato	Ácido cerótico	410	692.880
Metil octacosanoato	Ácido montánico	438	736.218
Metil triacontanoato	---	466	793.612

*Promedio de los tiempos de retención obtenidos en el análisis de cada muestra.

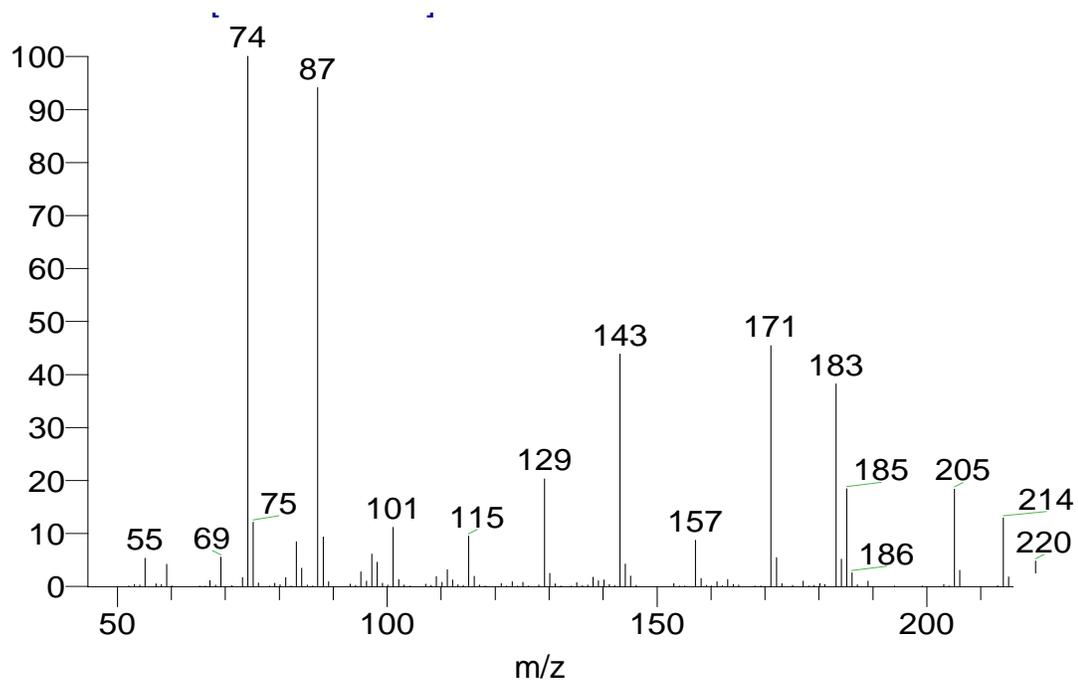


Figura A.21. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido dodecanoico, con un ión molecular de $m/z=214$

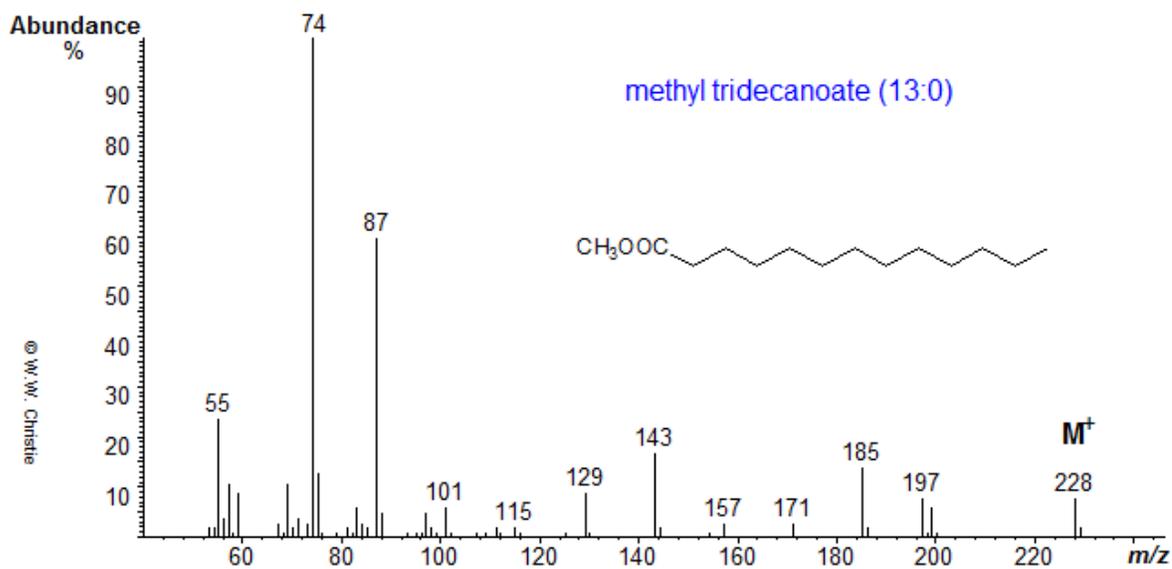


Figura A.22. Espectro de masas del éster metílico del ácido tridecanoico, con ión molecular $m/z =228$ (Christie, 2013)

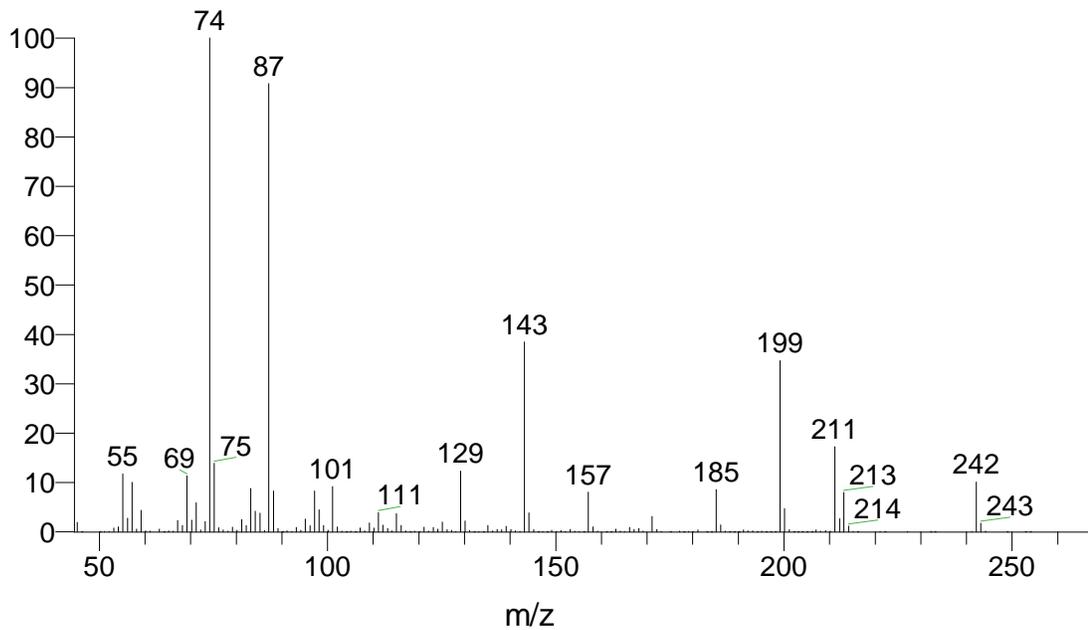


Figura A.23. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido mirístico, con ión molecular $m/z = 242$

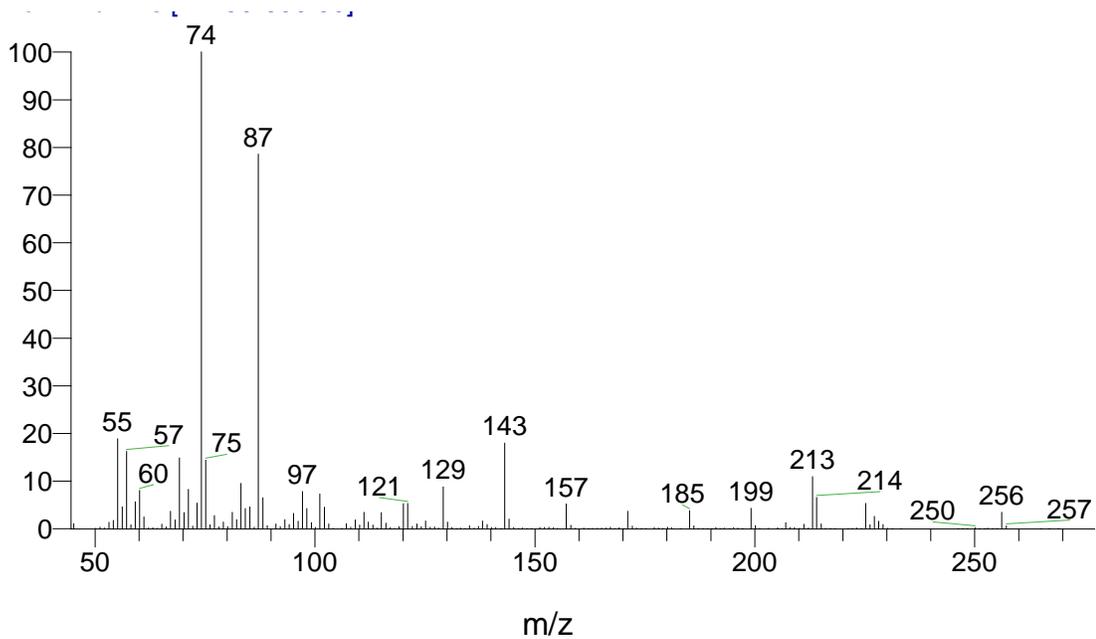


Figura A.24. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido pentadecanoico, con ión molecular $m/z = 256$

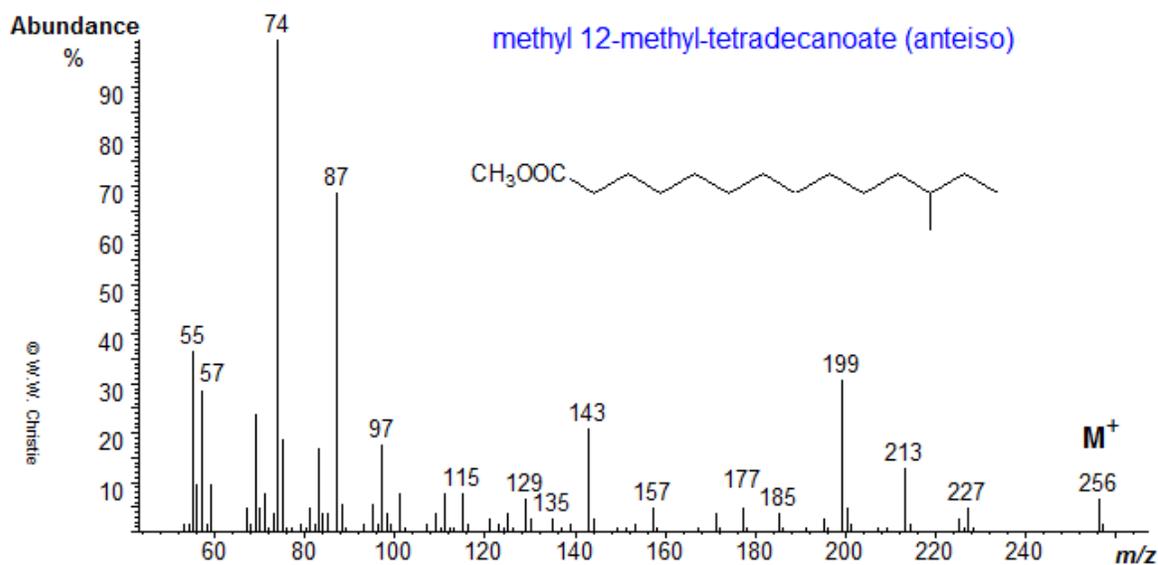


Figura A.25. Espectro de masas del éster metílico del ácido 12-metil-tetradecanoico, con un ión molecular de $m/z=256$ (Christie, 2013)

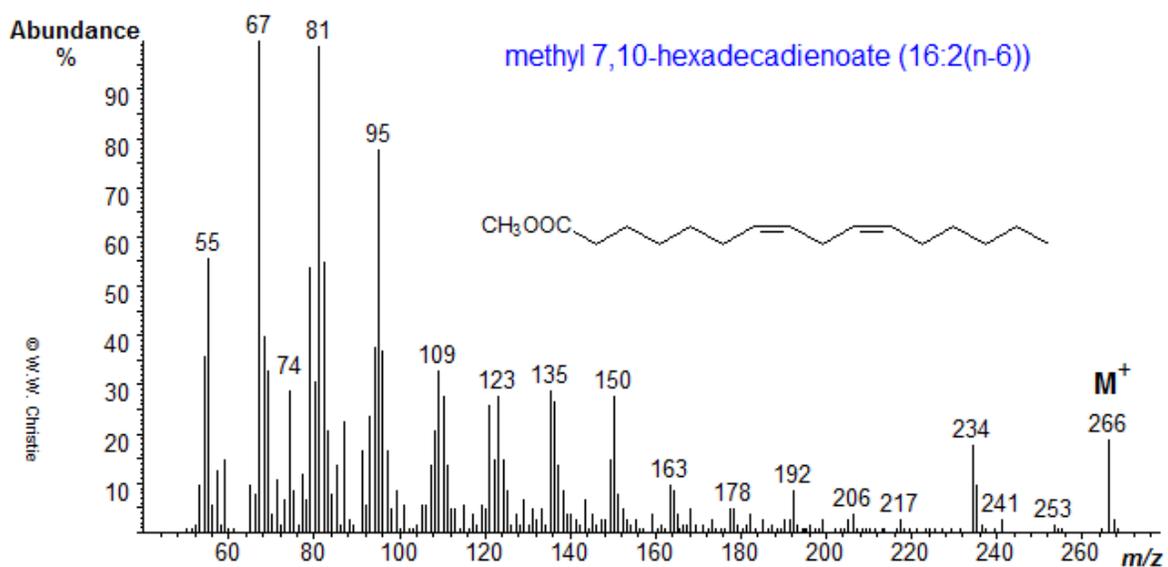


Figura A.26. Espectro de masas del éster metílico del ácido 7,10-metil-hexadecadienoico, con un ión molecular de $m/z=266$ (Christie, 2013)

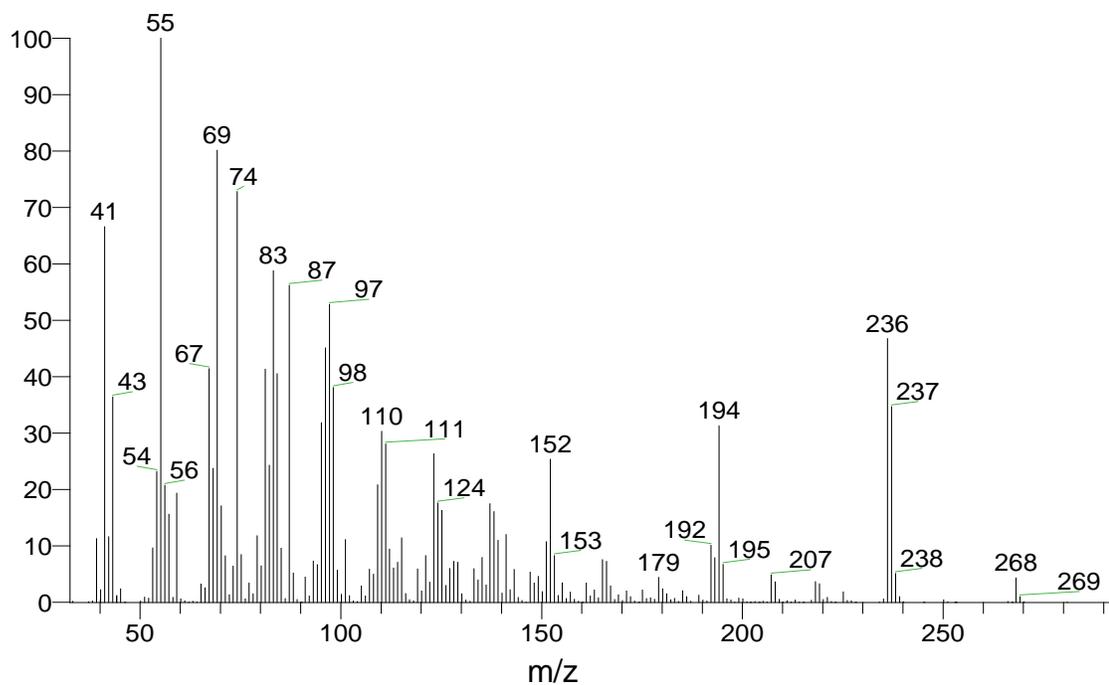


Figura A.27. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido palmitoleico, con un ión molecular de $m/z=268$

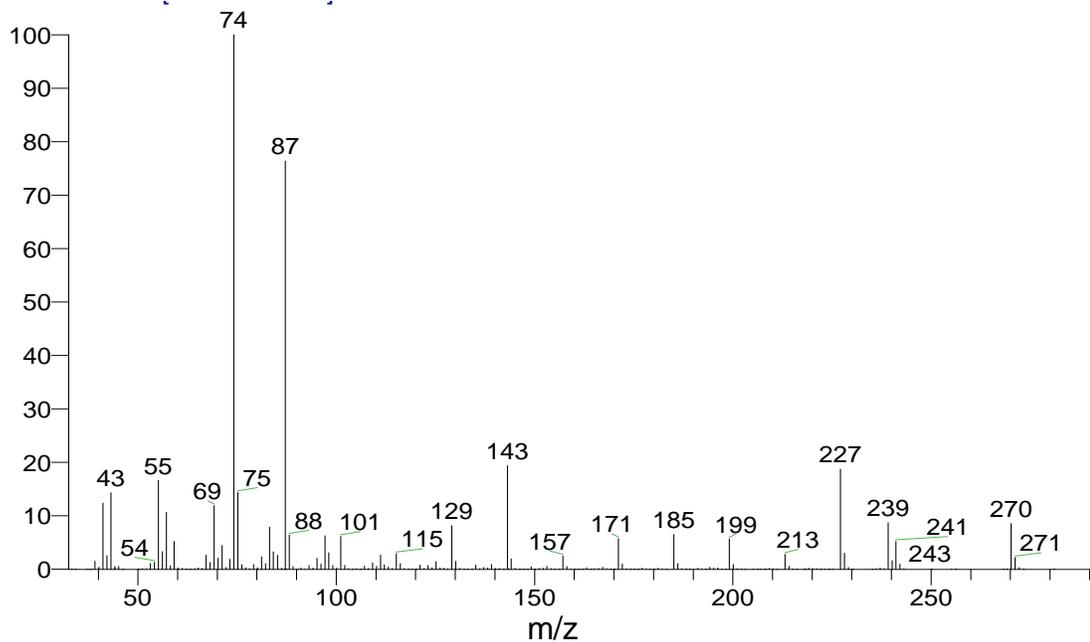


Figura A.28. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido palmítico, con ión molecular $m/z = 270$

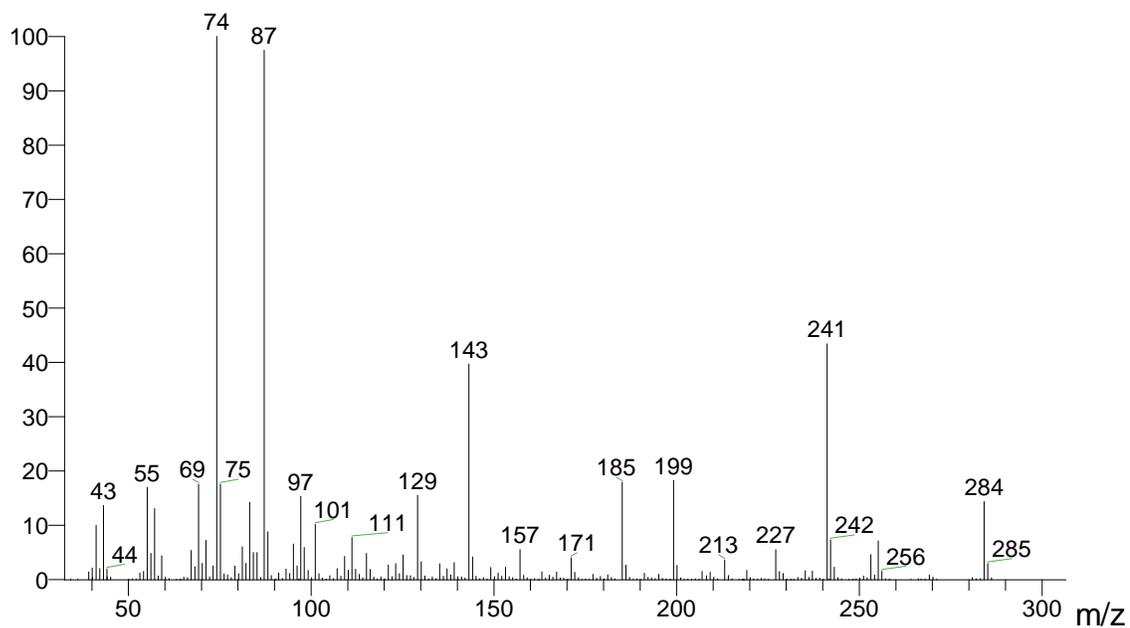


Figura A.29. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido heptadecanoico, con un ión molecular de $m/z=284$

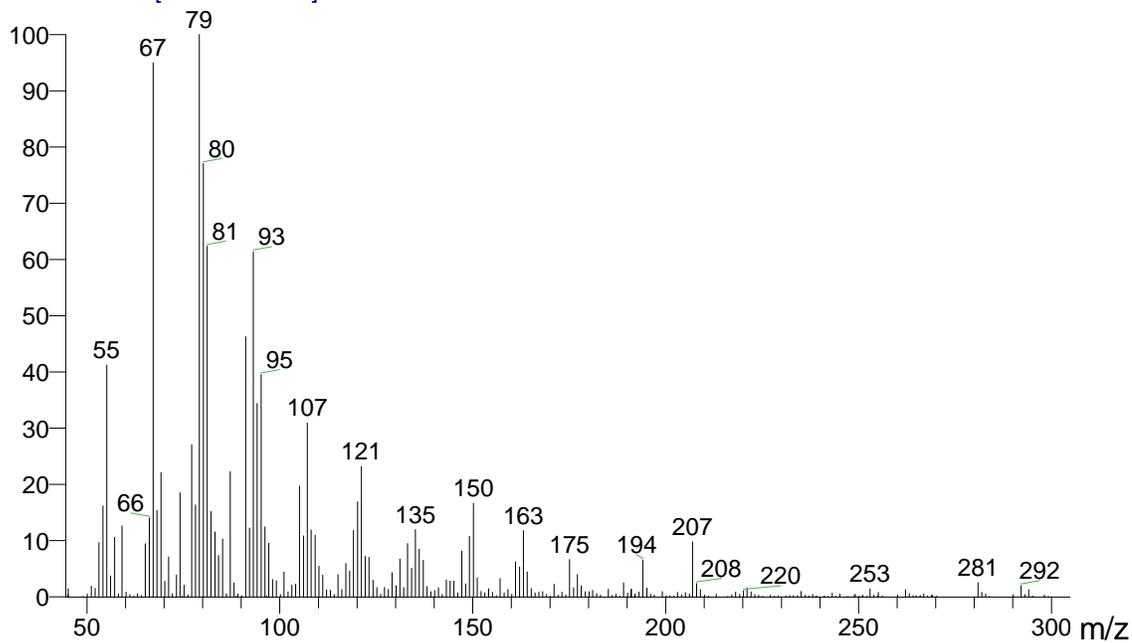


Figura A.30. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido linolénico, con un ión molecular de $m/z=292$

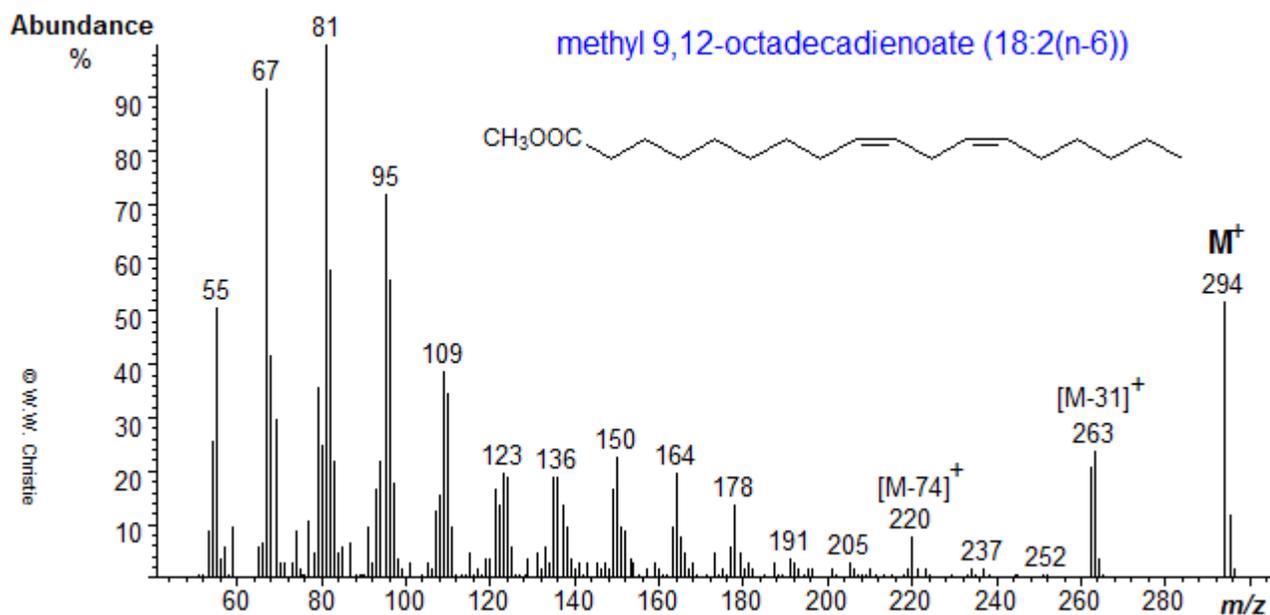


Figura A.31. Espectro de masas del éster metílico del ácido 9,12 octadecadienoico (ácido linoleico) con un ión molecular de $m/z=294$ (Christie, 2013)

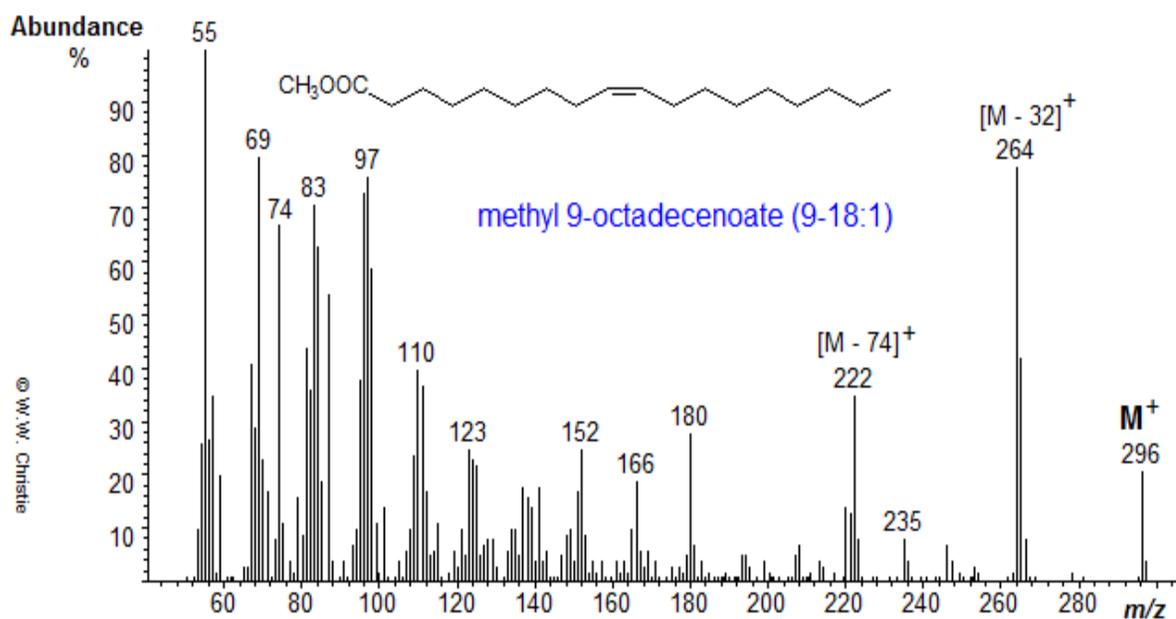


Figura A.32. Espectro de masas del éster metílico del ácido 9-octadecenoico (ácido oleico), con un ión molecular de $m/z=296$ (Christie, 2013)

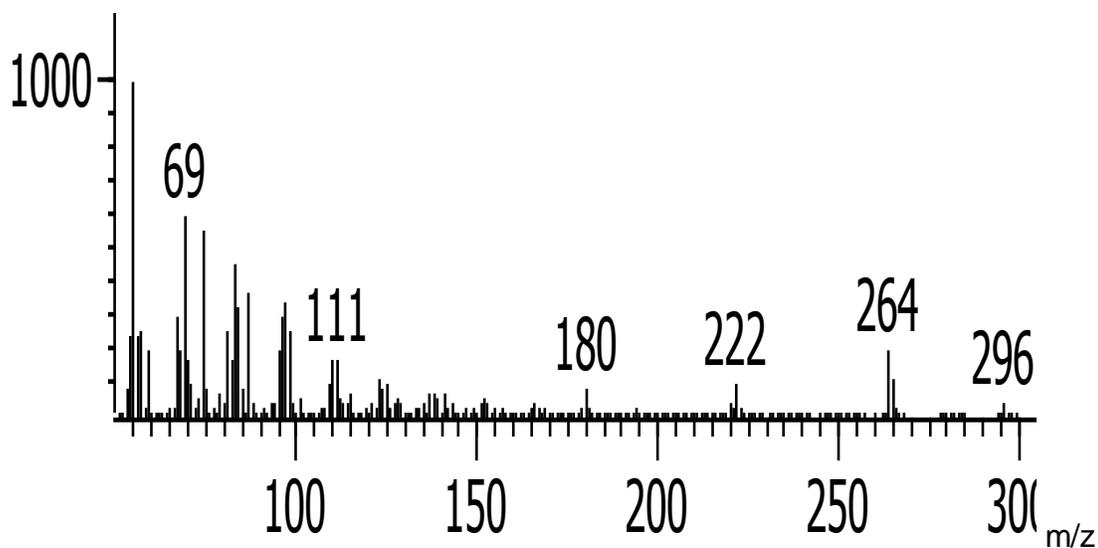


Figura A.33. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 10-octadecenoico (isómero del ácido oleico), con un ión molecular de $m/z=296$

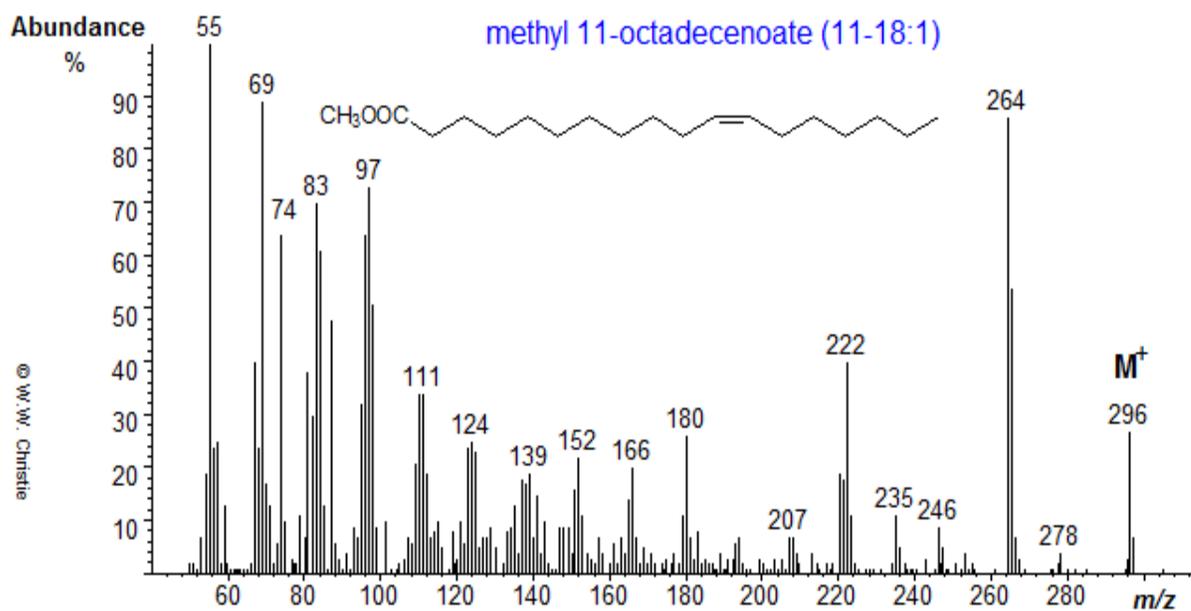


Figura A.34. Espectro de masas del éster metílico del ácido 11-octadecenoico (isómero del ácido oleico), con un ión molecular de $m/z=296$ (Christie, 2013)

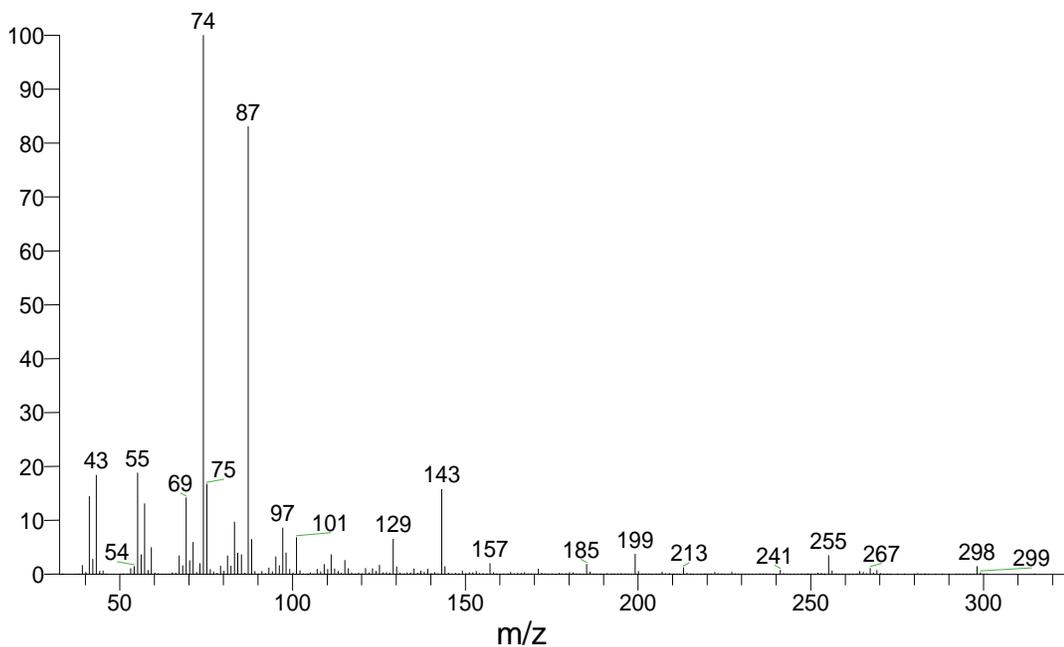


Figura A.35. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido esteárico, con un ión molecular de $m/z=298$

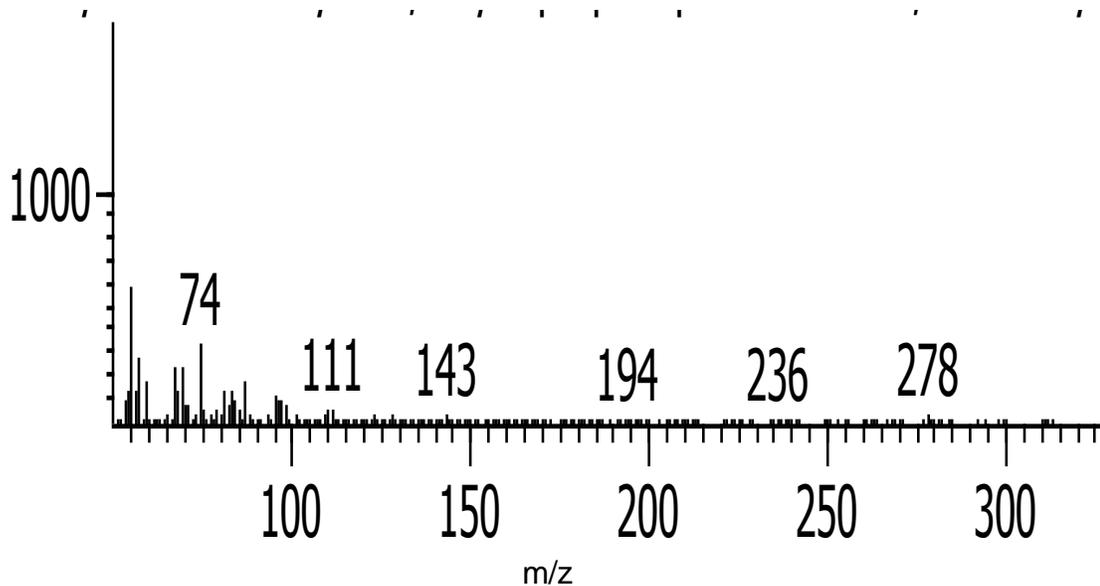


Figura A.36. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido ciclopropanopentanoico, 2-undecilo, con un ión molecular de $m/z=310$

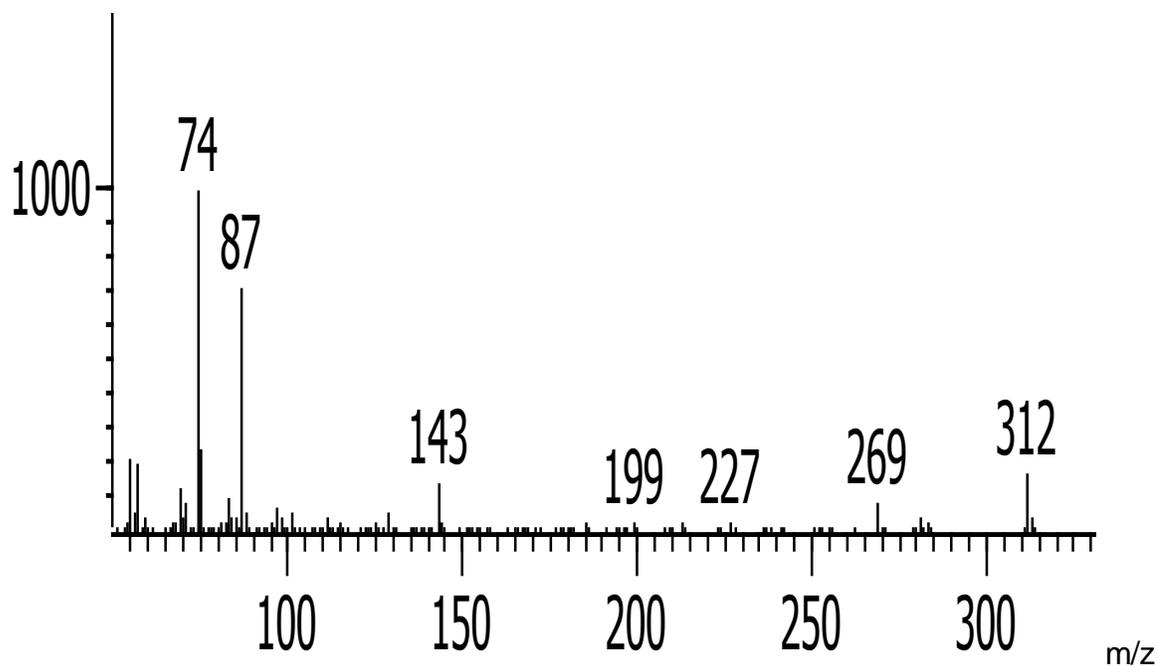


Figura A.37. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido nonadecanoico (19:00), con un ión molecular de $m/z=312$

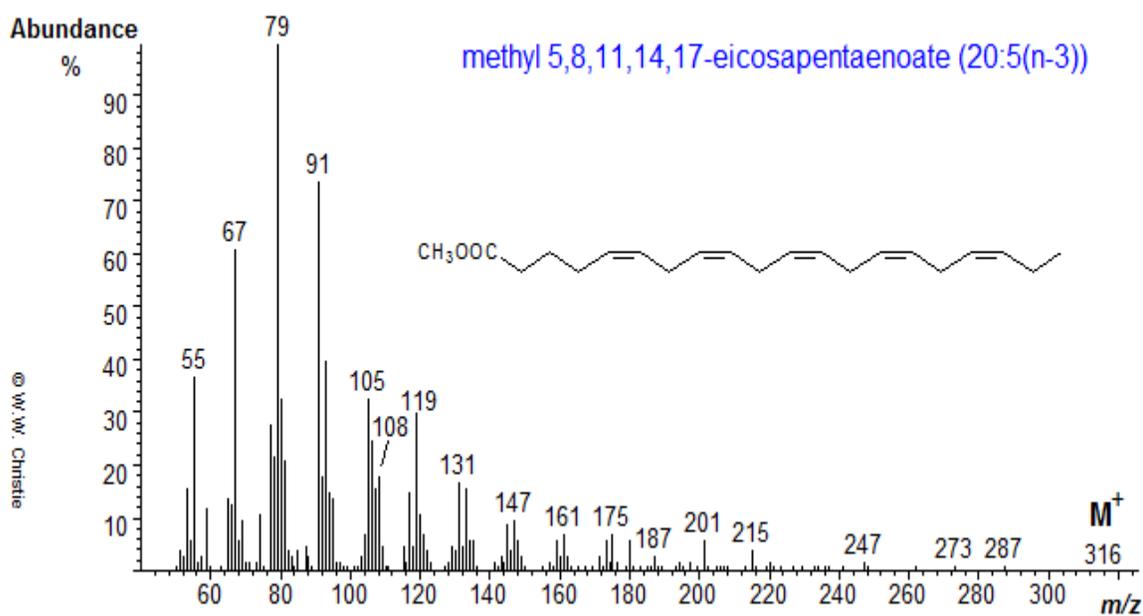


Figura A.38. Espectro de masas del éster metílico del ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, con un ión molecular de $m/z=316$ (Christie, 2013)

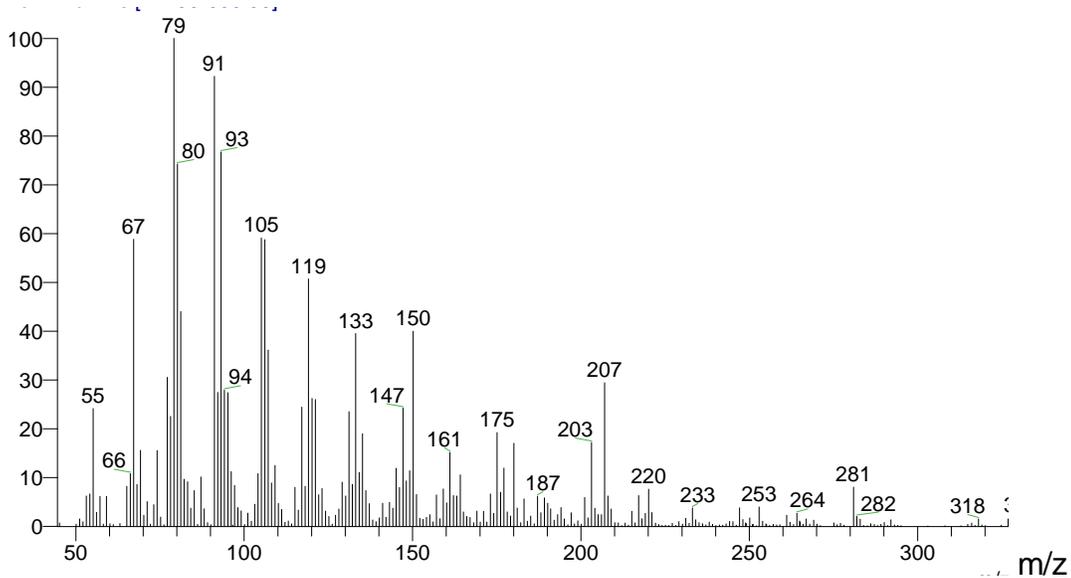


Figura A.39. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido araquídico, con un ión molecular de $m/z=318$

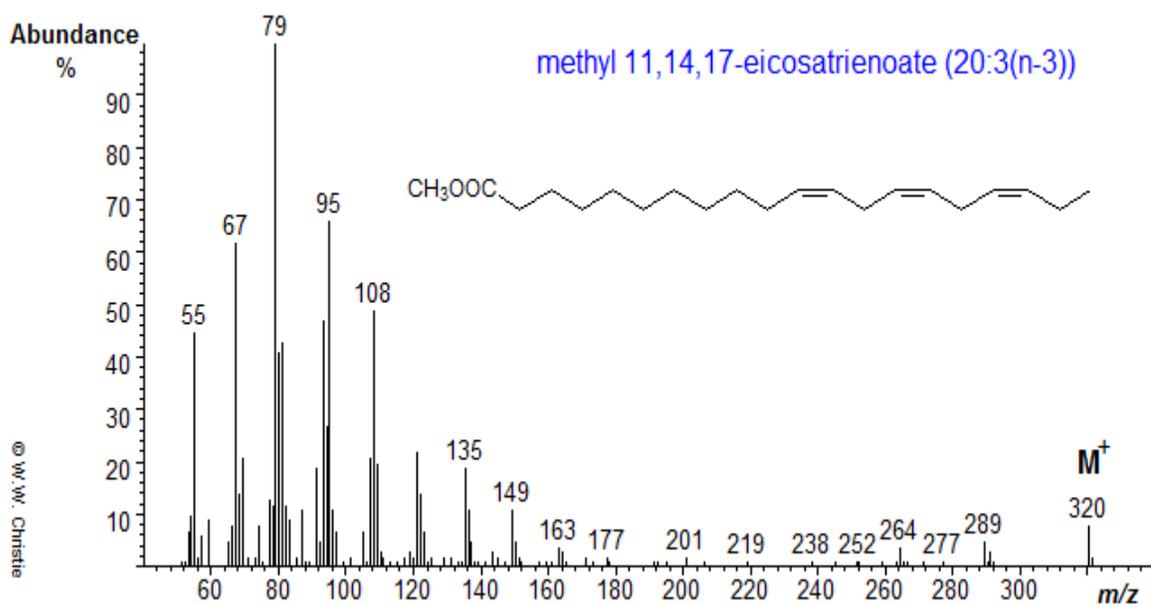


Figura A.40. Espectro de masas del éster metílico del ácido 11,14,17-eicosatrienoico, con un ión molecular de $m/z=320$ (Christie, 2013)

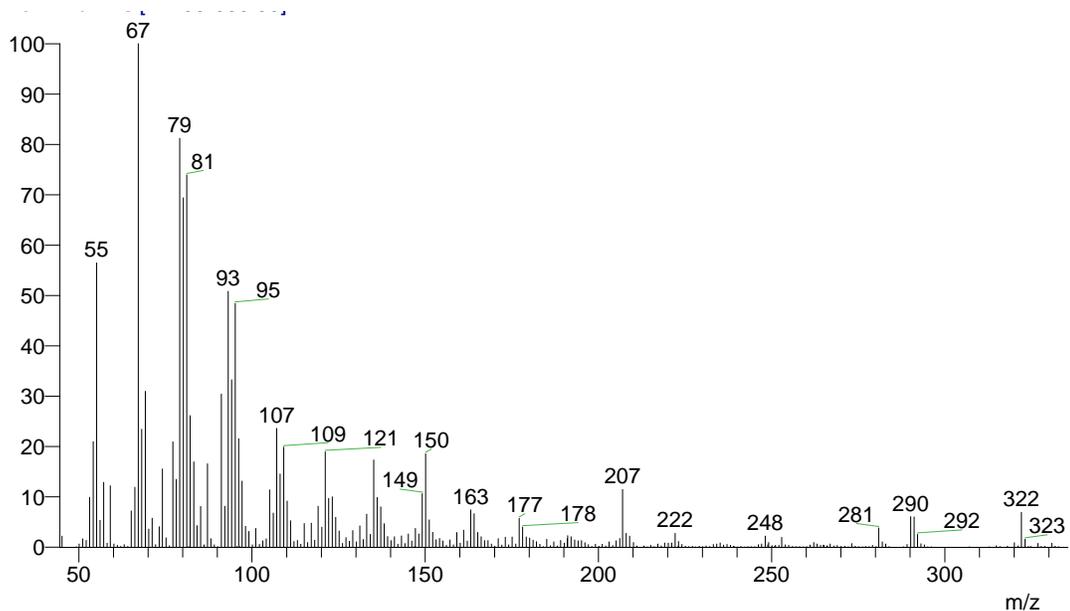


Figura A.41. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido eicosadienoico, con un ión molecular de $m/z=322$

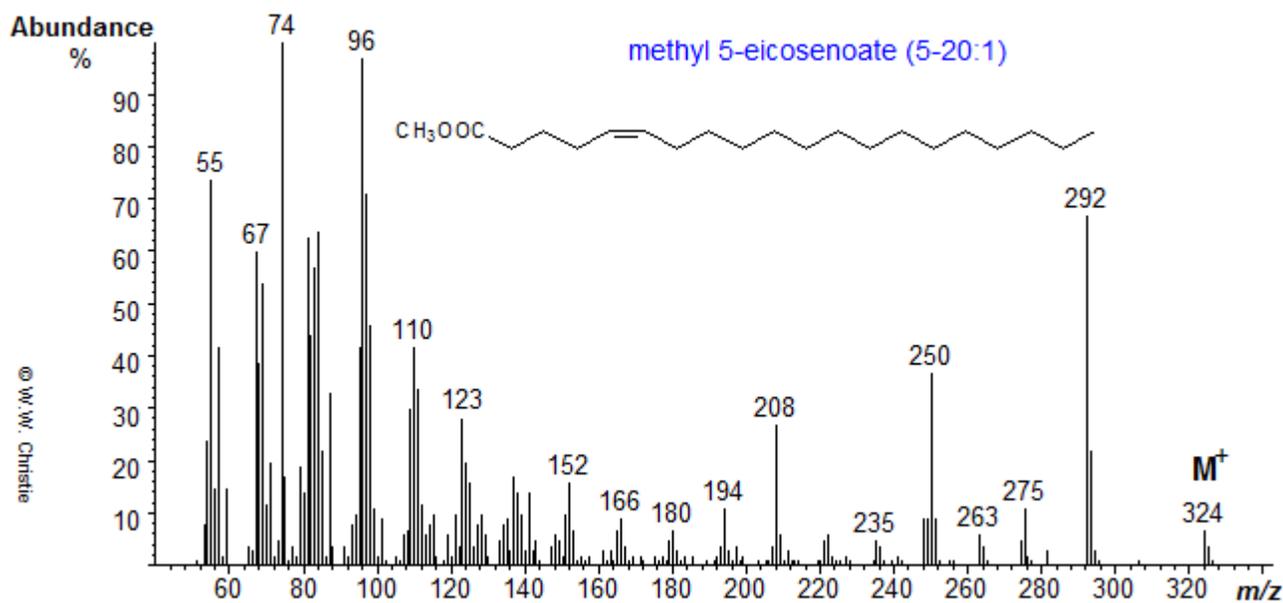


Figura A.42. Espectro de masas del éster metílico del ácido 5-eicosenoico, con un ión molecular de $m/z=324$ (Christie, 2013)

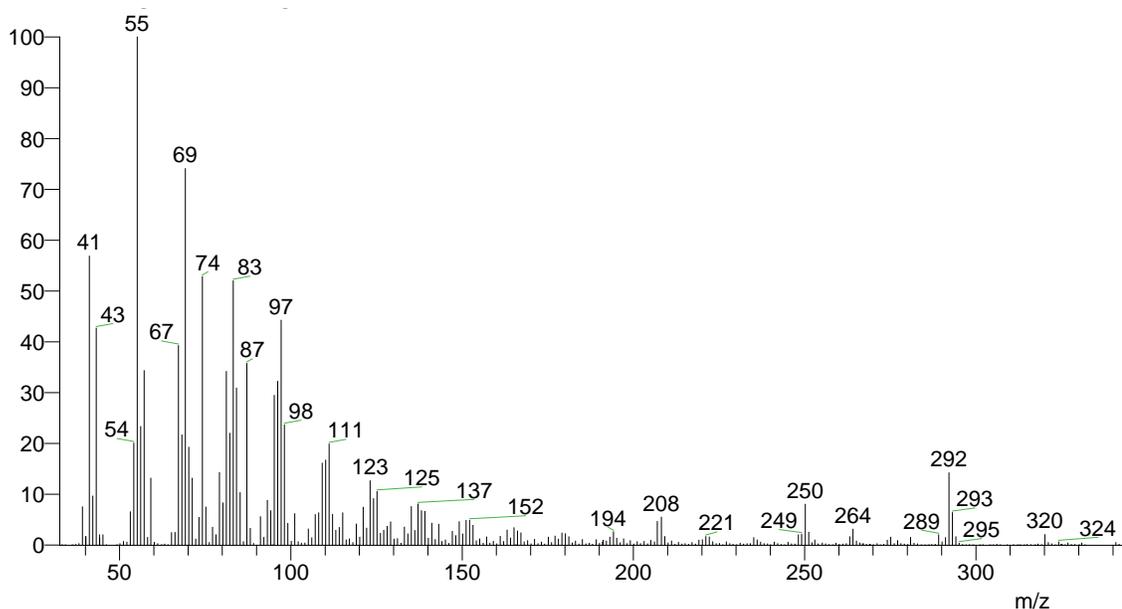


Figura A.43. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 11-eicosenoico, con un ión molecular de $m/z=324$

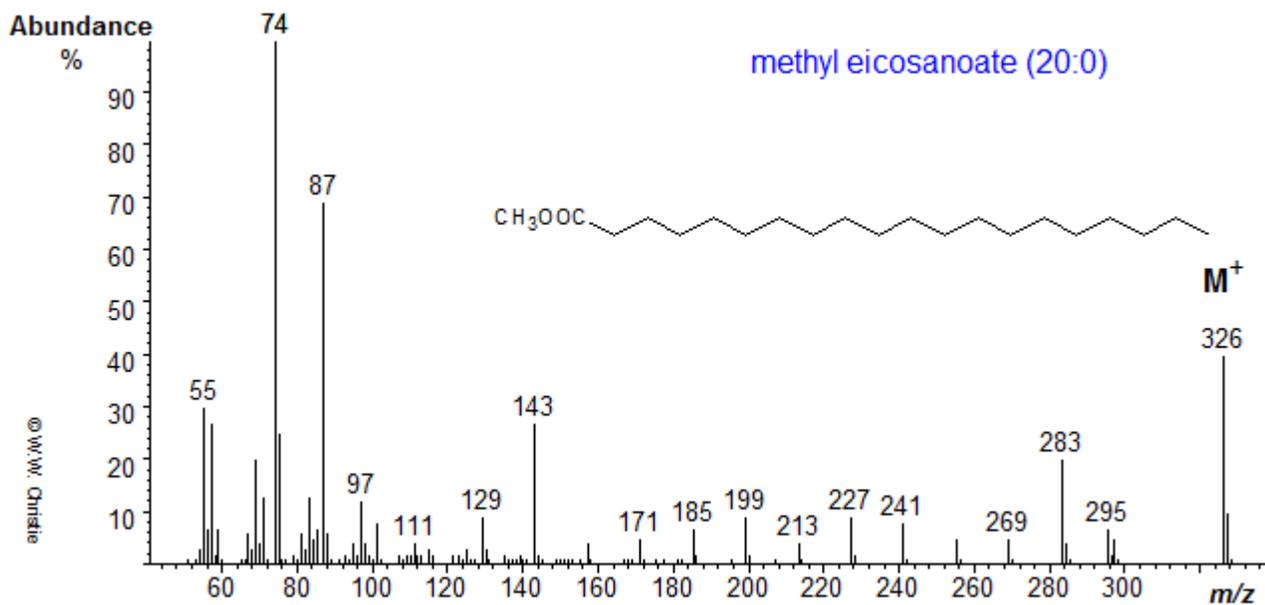


Figura A.44. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido eicosanoico, con un ión molecular de $m/z=326$ (Christie, 2013)

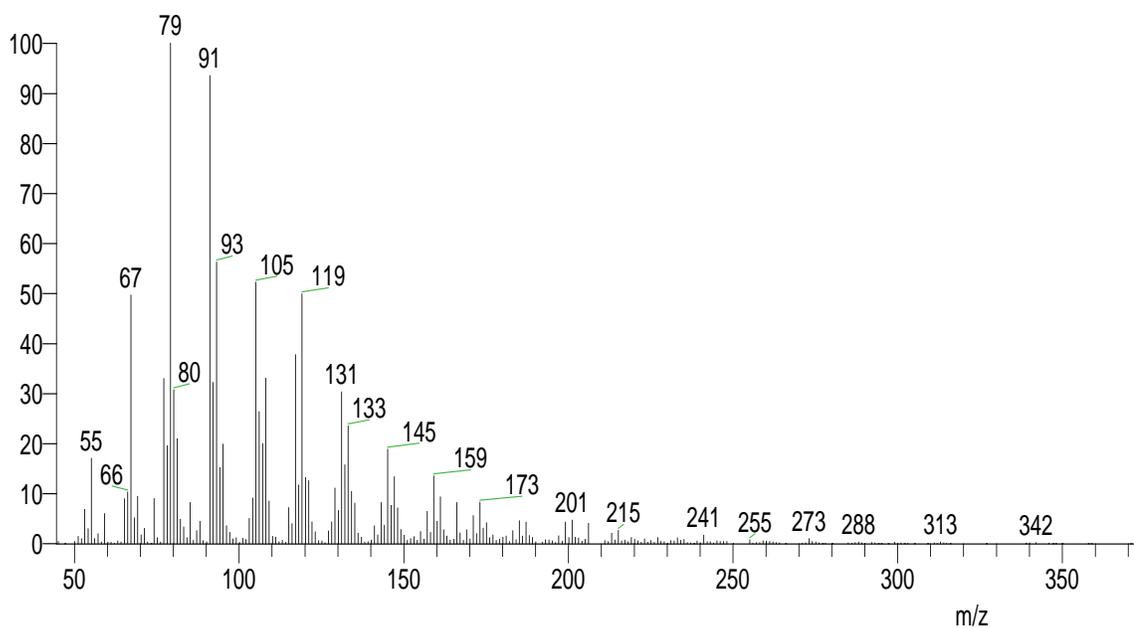


Figura A.45. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido docosahexenoico, con un ión molecular de $m/z=342$

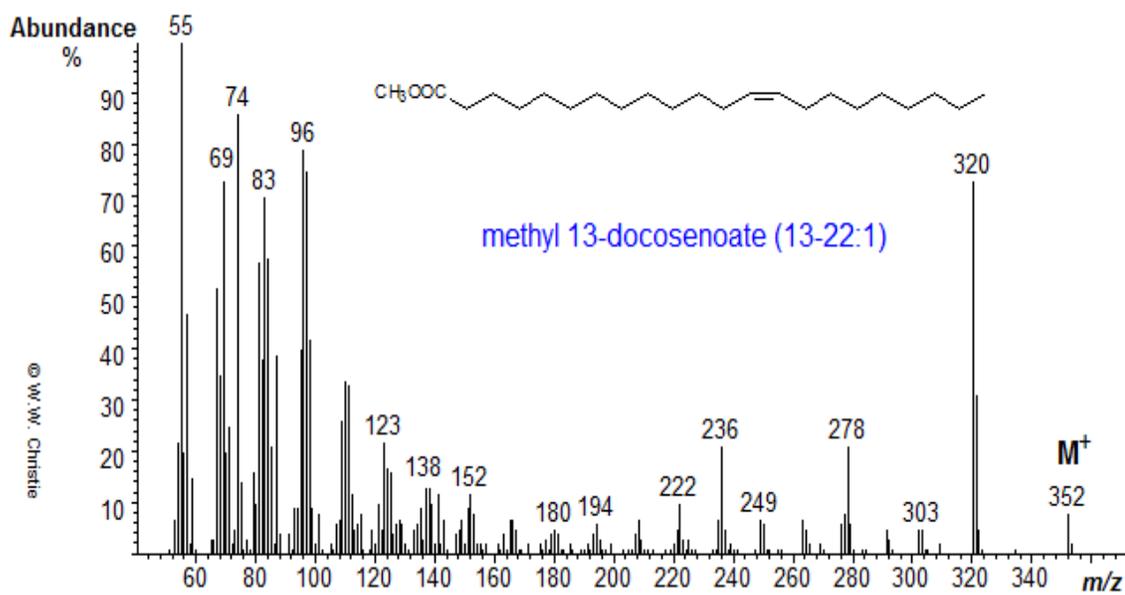


Figura A.46. Espectro de masas del éster metílico del ácido 13-docosenoico, con un ión molecular de $m/z=352$ (Christie, 2013)

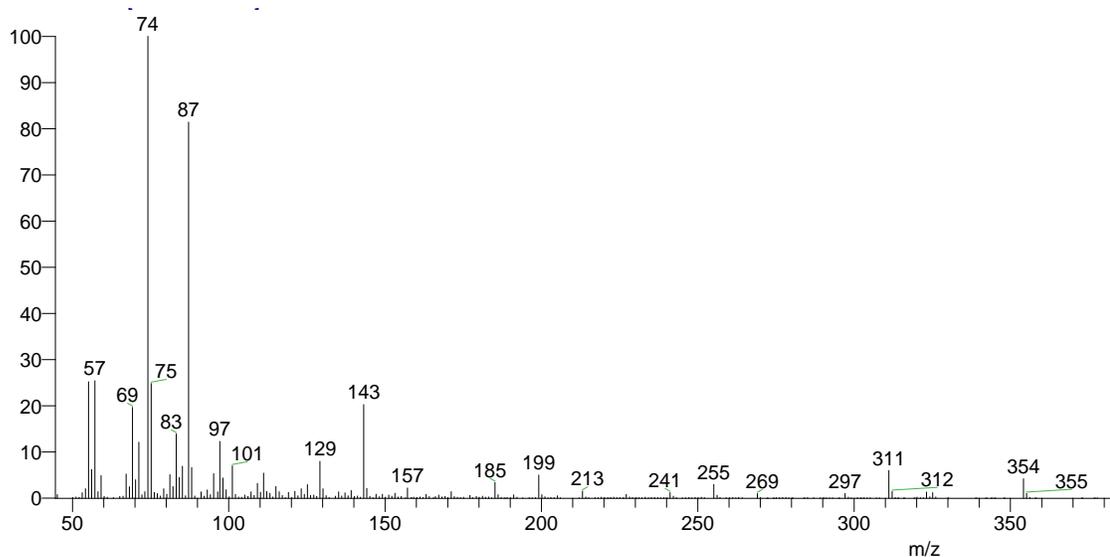


Figura A.47. Espectro de masas por *EI* (Impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 20-metil-heneicosanoico (iso), con un ión molecular de $m/z=354$

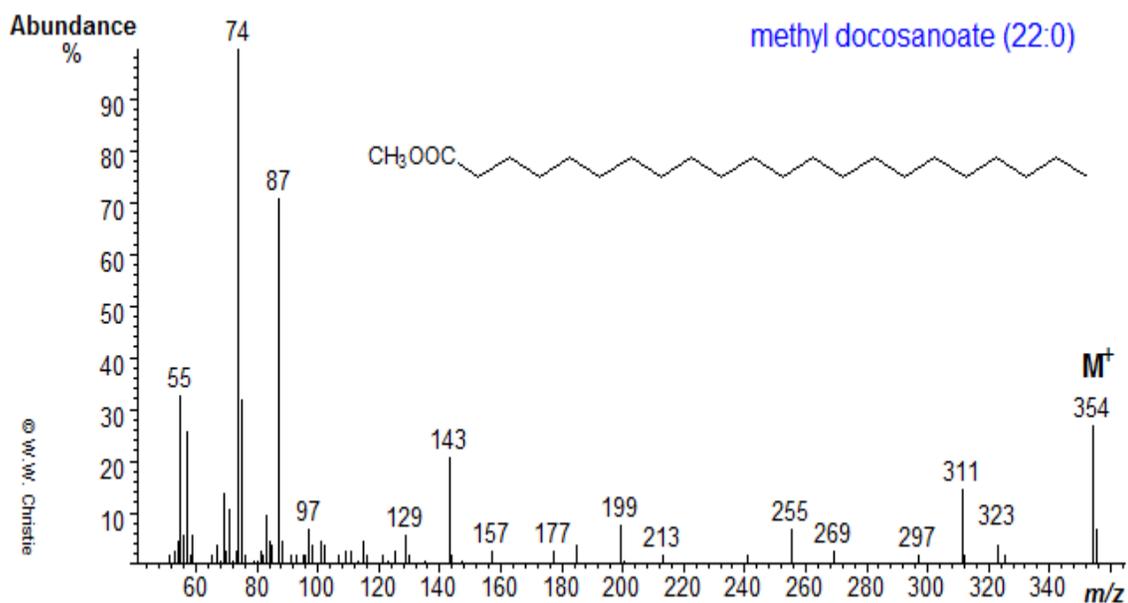


Figura A.48. Espectro de masas del éster metílico del ácido docosanoico, con un ión molecular de $m/z=354$ (Christie, 2013)

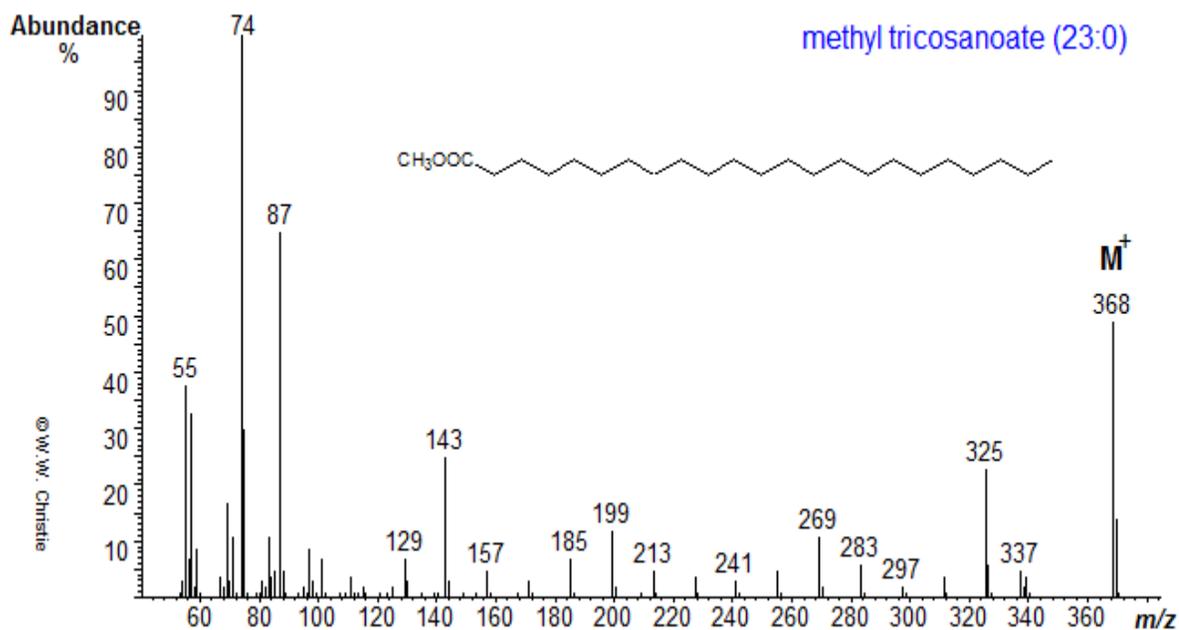


Figura A.49. Espectro de masas del éster metílico del ácido tricosanoico, con un ión molecular de $m/z=368$ (Christie, 2013)

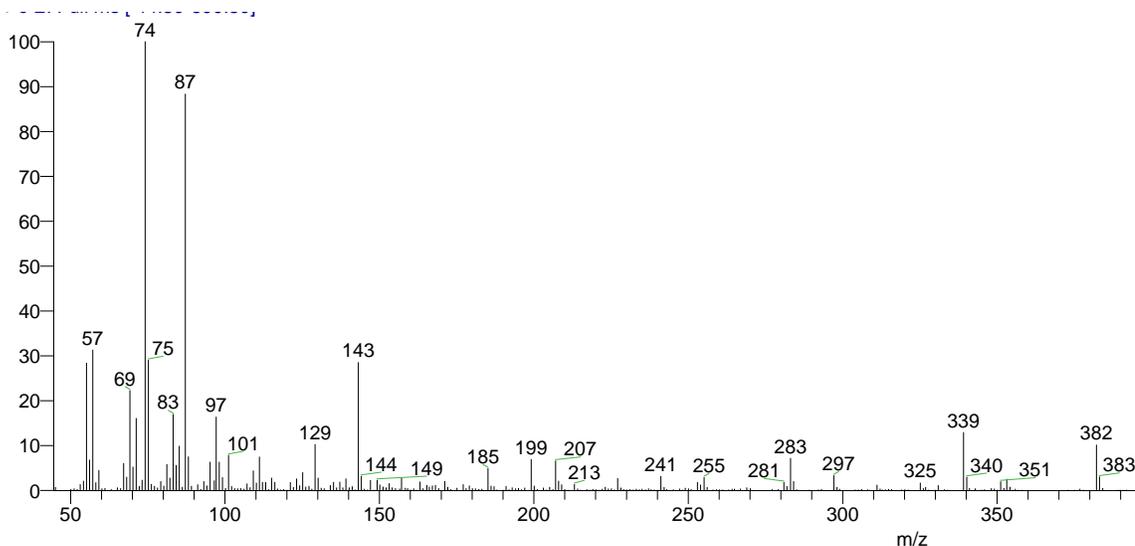


Figura A.50. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido tetracosanoico, con un ión molecular de $m/z=382$

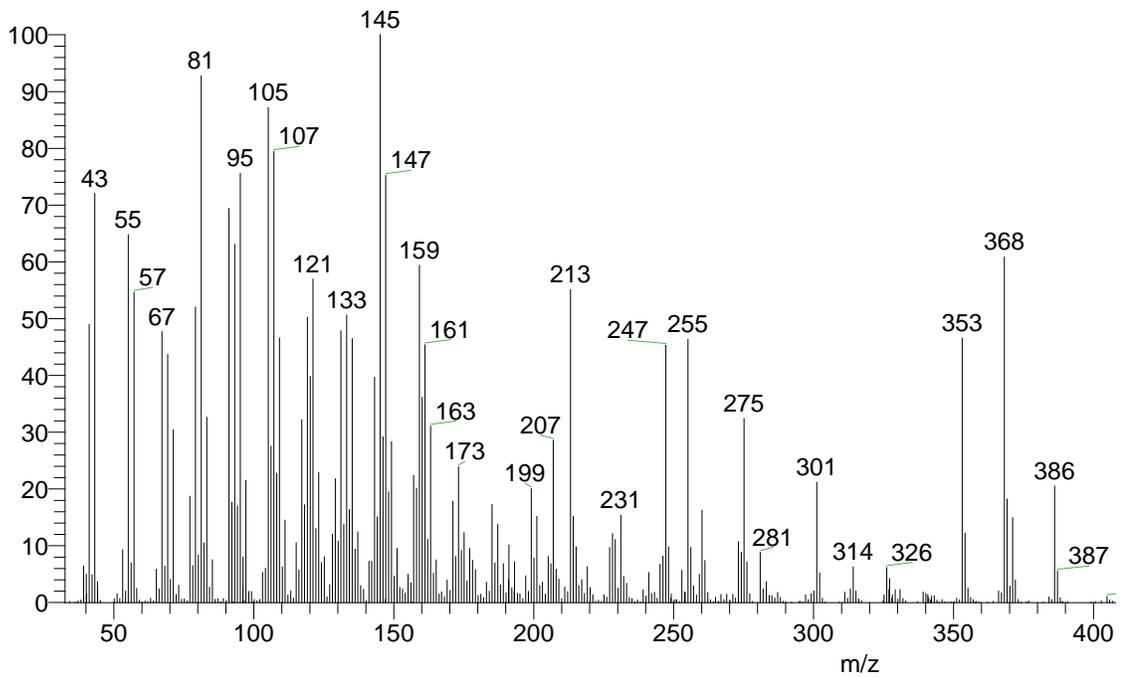


Figura A.51. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del colesterol, con un ión molecular de $m/z=386$

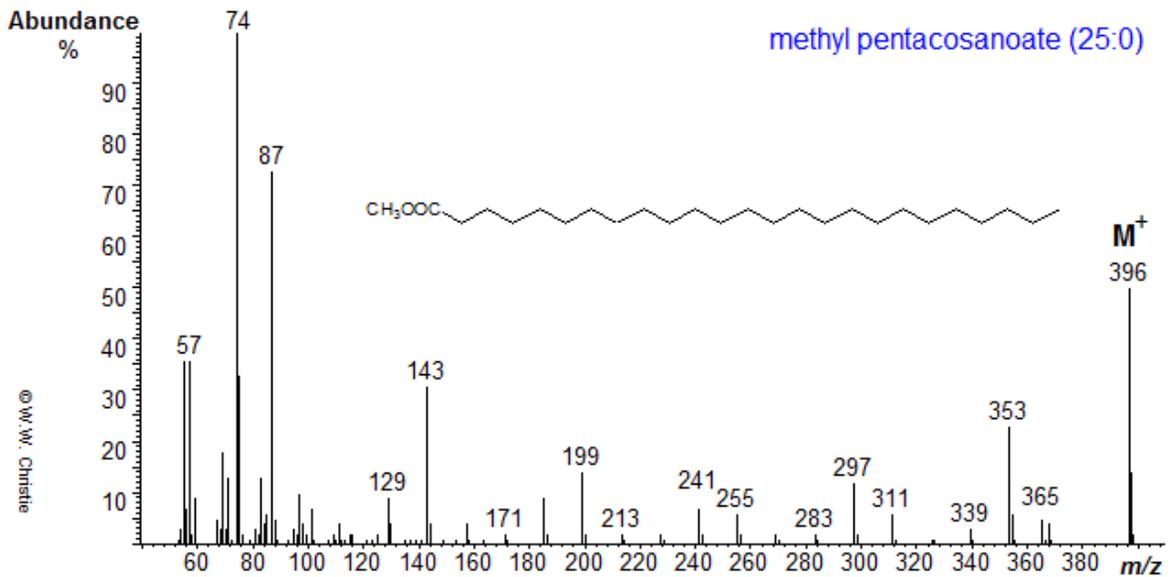


Figura A.52. Espectro de masas del éster metílico del ácido pentadecanoico, con un ión molecular de $m/z=396$ (Christie, 2013)

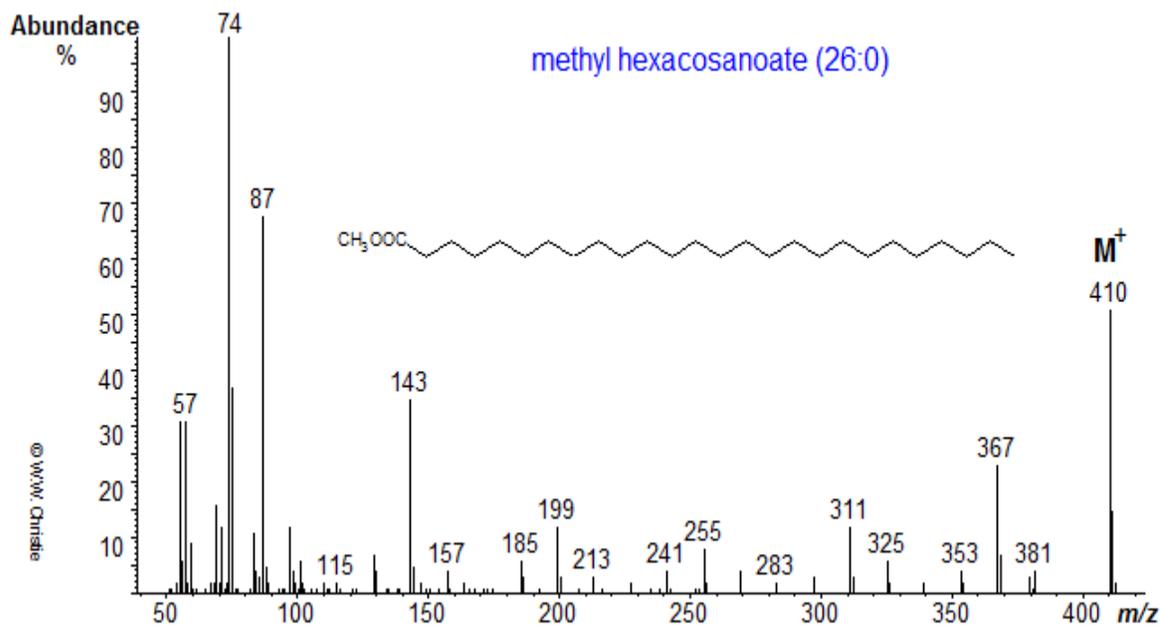


Figura A.53. Espectro de masas del éster metílico del ácido hexacosanoico, con un ión molecular de $m/z=410$ (Christie, 2013)

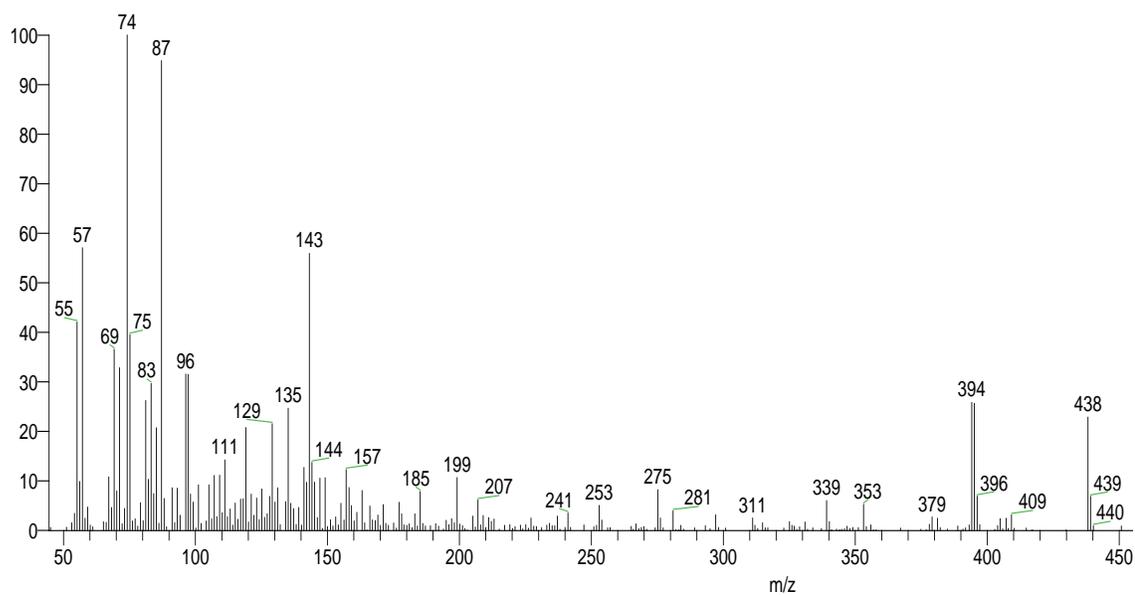


Figura A.54. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido octacosanoico, con ión molecular de $m/z = 438$

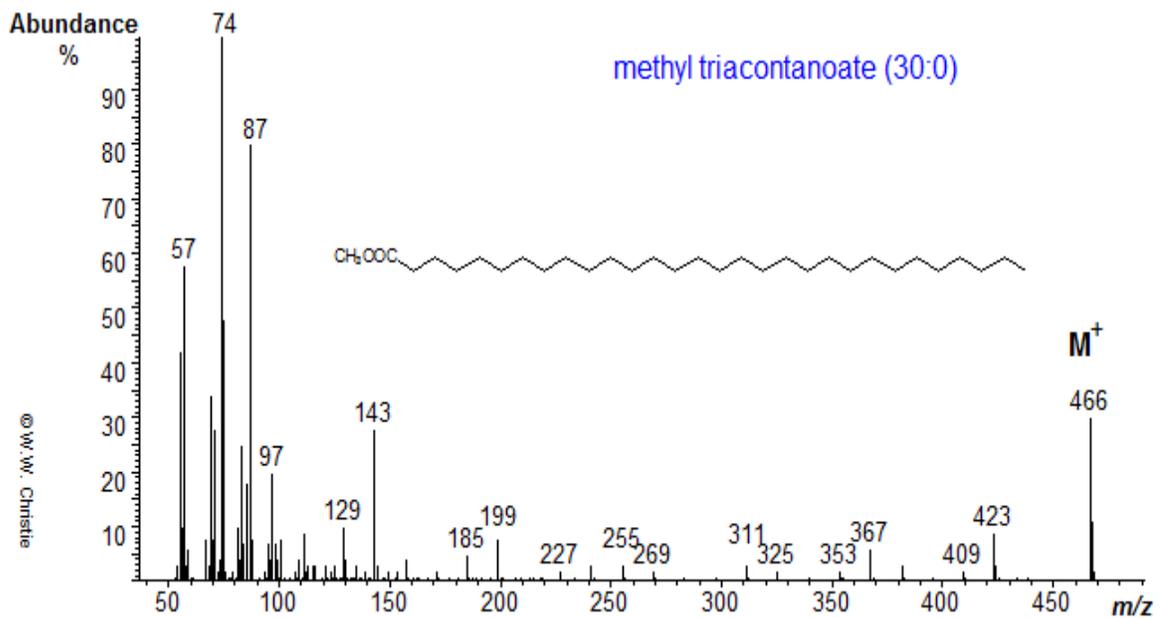


Figura A.55. Espectro de del éster metílico del ácido tricontanoico, con un ión molecular de $m/z=466$ (Christie, 2013)

ANEXO B Diagramas ecológicos

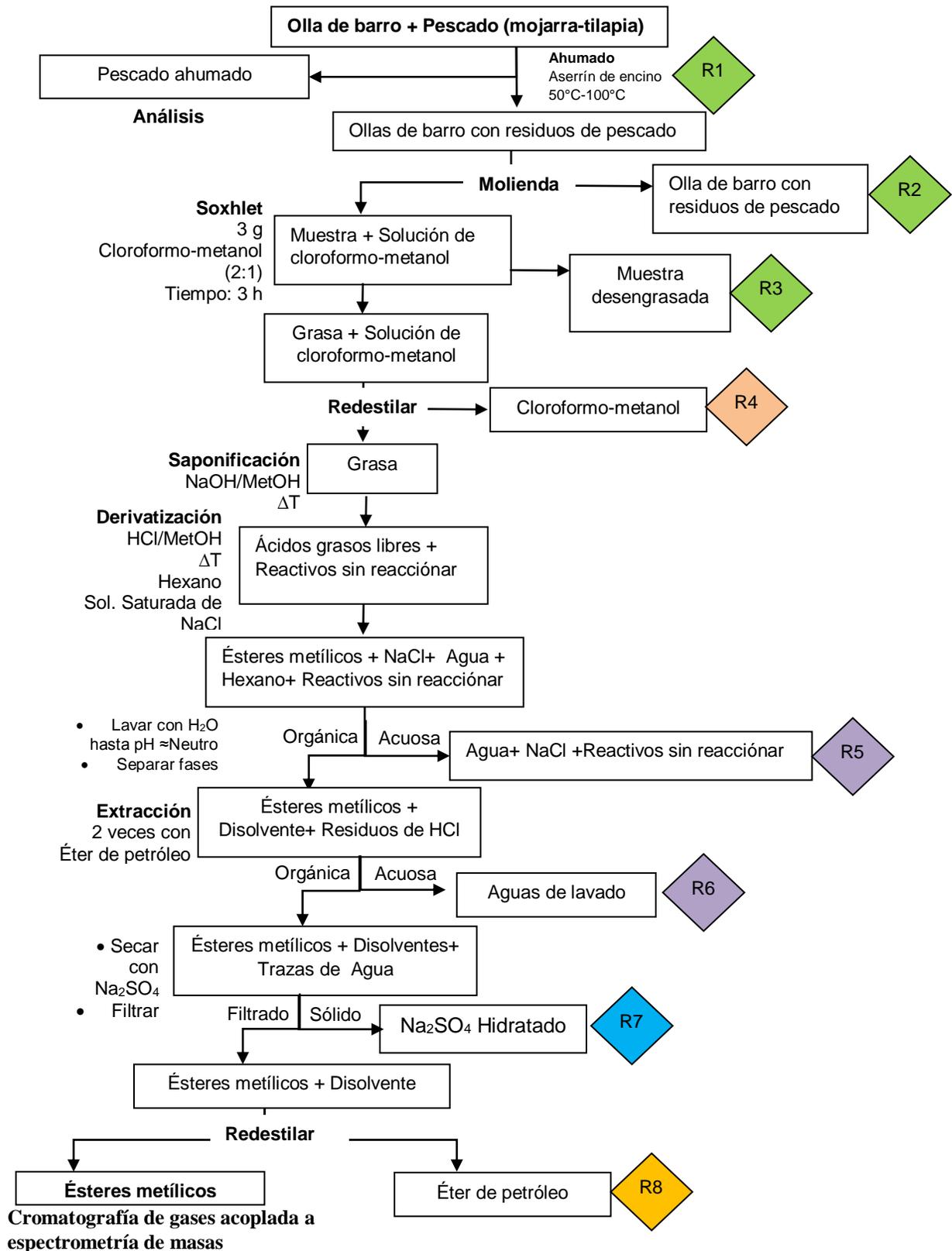


Diagrama ecológico E.1. Obtención de ésteres metílicos a partir de una olla de barro con residuos de pescado ahumado (experimento piloto)

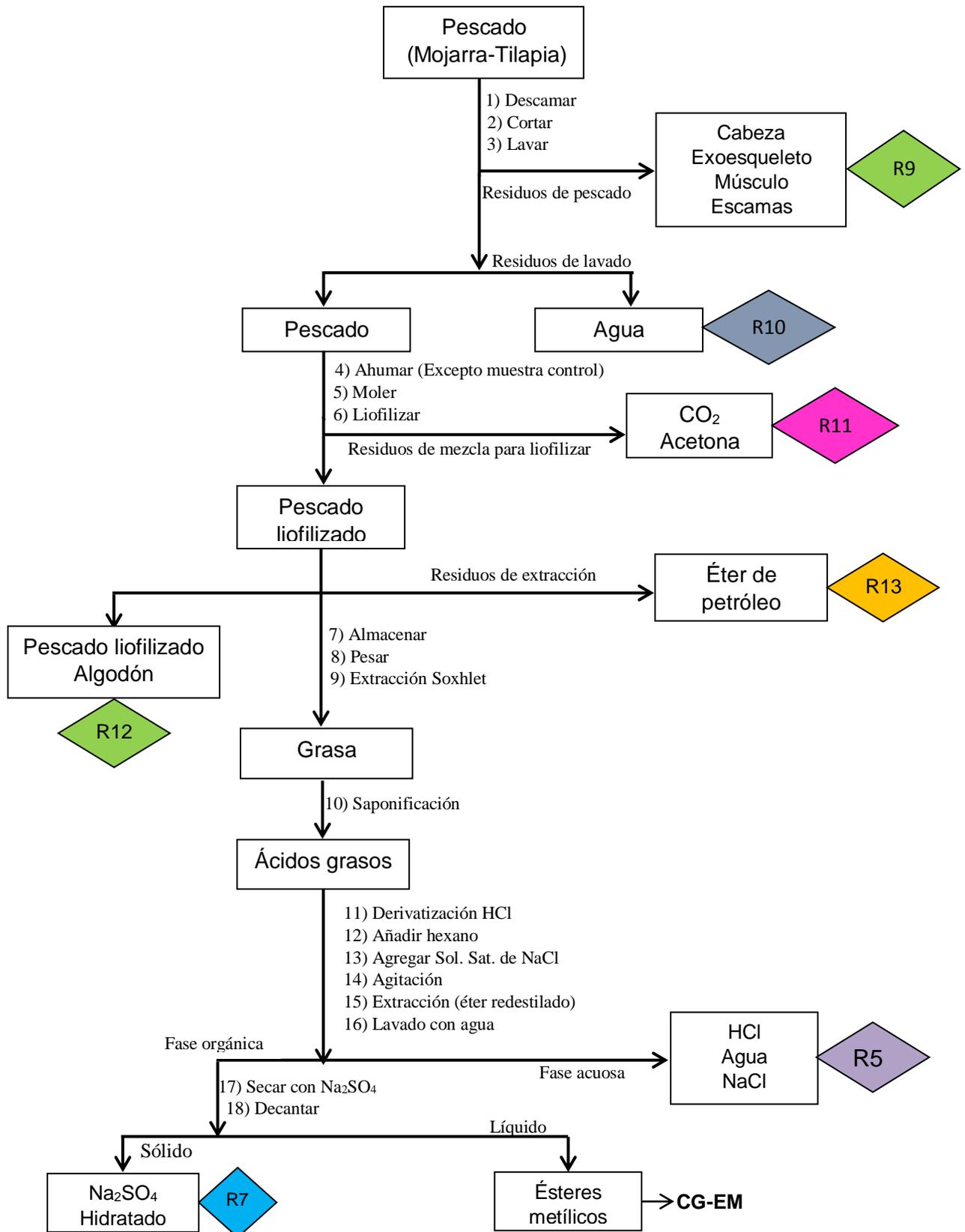
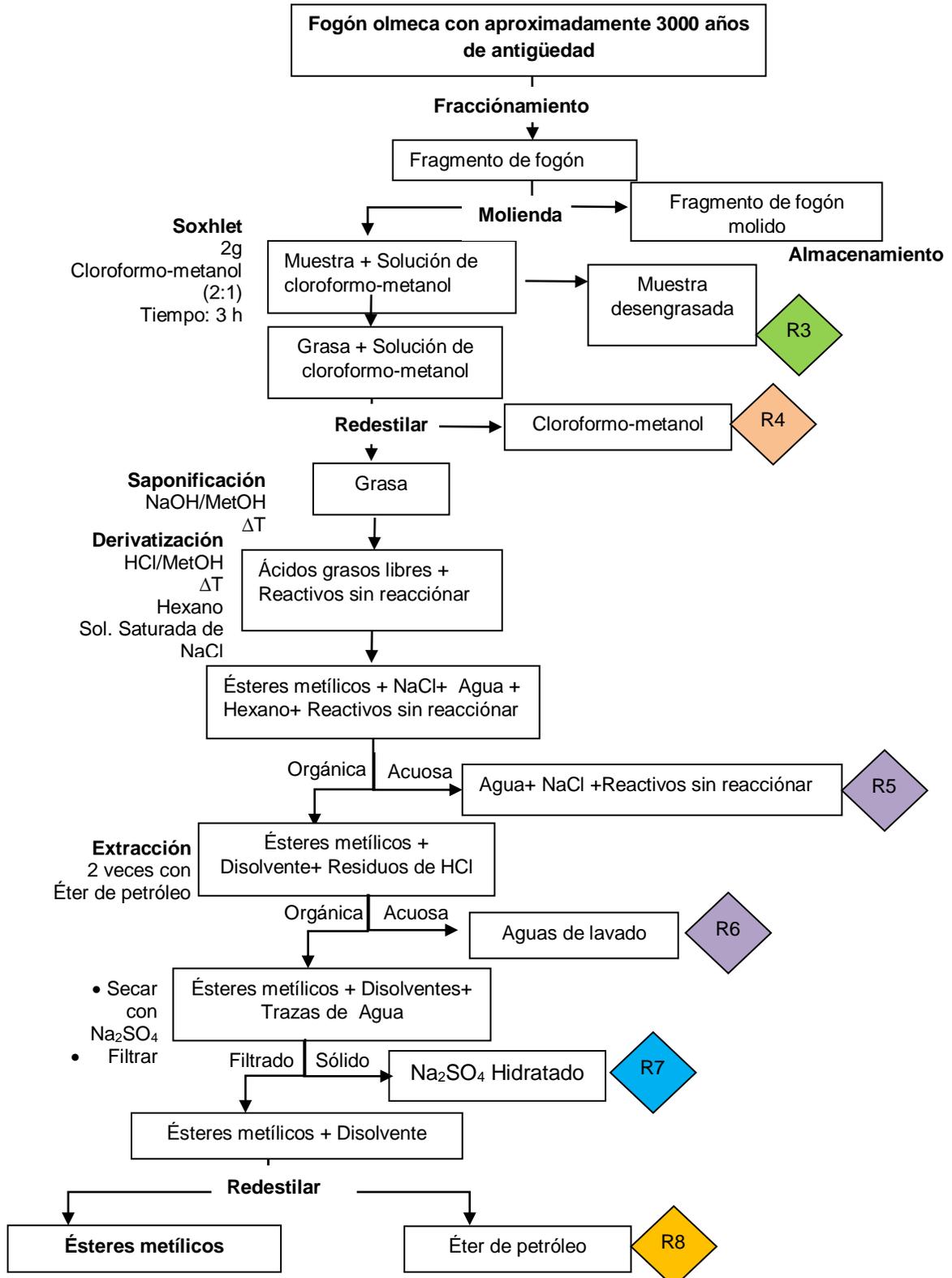


Diagrama ecológico E.2. Obtención de ésteres metílicos de pescado



Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Diagrama ecológico E.3. Obtención de ésteres metílicos a partir de un fogón olmeca con aproximadamente 3000 años de antigüedad

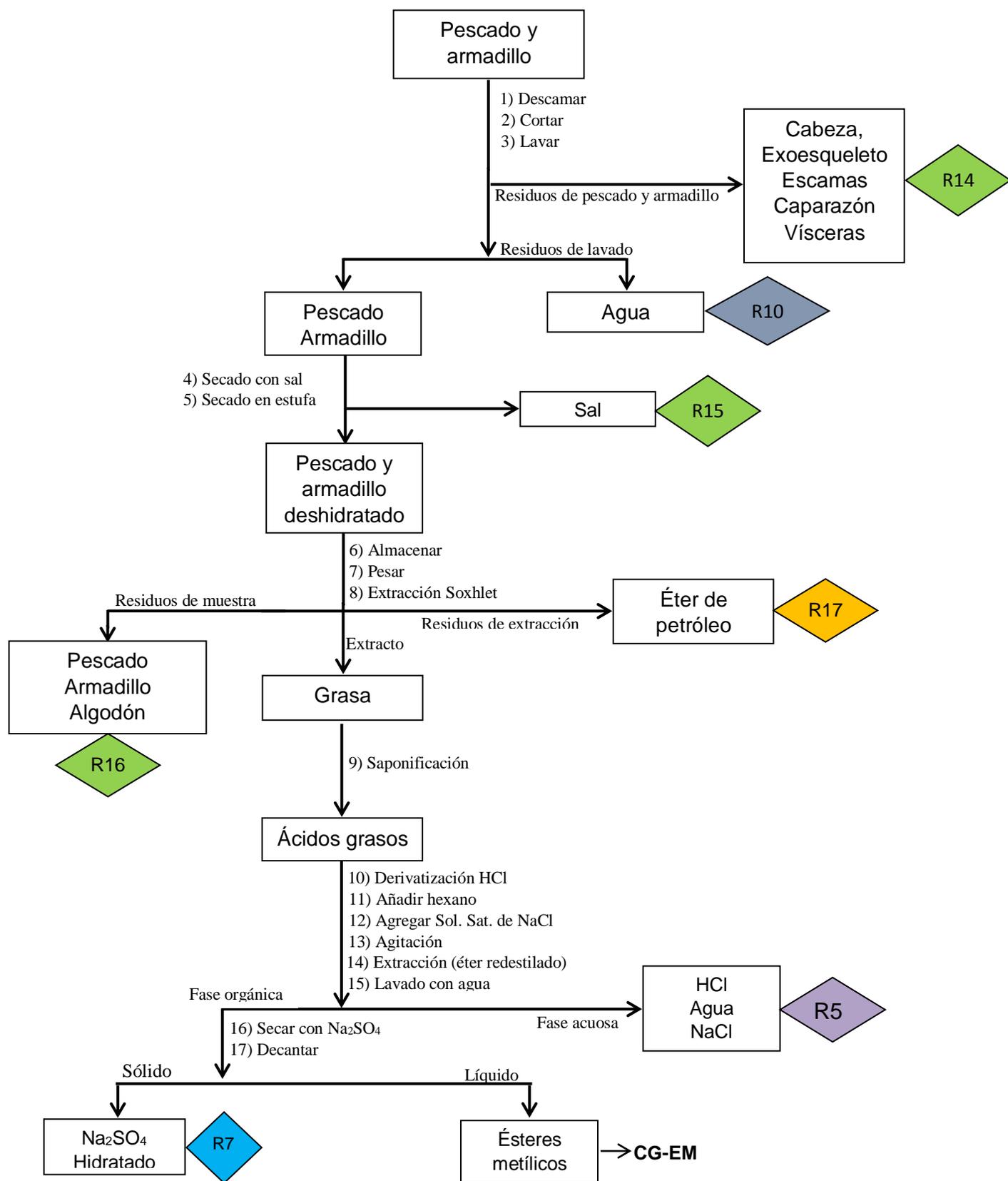


Diagrama ecológico E.4. Obtención de ésteres metílicos de pescado y armadillo

Residuos

R1, R2, R9, R14 y R15. Residuos orgánicos no peligrosos. Se envían a disposición para producir composta o se desechan en la basura orgánica.

R3, R12 y R16. Muestra desengrasada (Carne/olla con residuos/fragmento arqueológico) y algodón, con restos de disolvente orgánico. Se deja evaporar el resto del disolvente en campana⁴ y se envía a disposición para producir composta o se desechan en la basura orgánica

R4. Mezcla de cloroformo-metanol que puede ser reutilizado si no está contaminado con trazas de barro. En caso de desecharlo, se coloca en un frasco, se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM.

R5 y R6. Residuos de NaCl, HCl y trazas de metanol. Se neutralizan con NaOH, se evapora el metanol en campana y la fase líquida se desecha en el drenaje con otros residuos no peligrosos.

R7. Na₂SO₄ hidratado que se recristaliza y se seca (agregando etanol y en estufa) para ser reutilizado.

R8, R13 y R17. Éter de petróleo, que puede ser reutilizado si se coloca en el rotavapor. En caso de desecharlo, se coloca en un frasco, se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM.

R10. Agua de lavado de pescado. Se desecha en el drenaje con otros residuos no peligrosos.

R11. CO₂ y acetona. Se deja que se evapore la mezcla en campana⁴ de extracción

⁴ Al usar la campana de extracción se recicla el carbón activado de la campana para que el material absorbido se transforme en compuestos inocuos