



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LOS INDICADORES DEL ESTADO DE
PRESERVACIÓN DE COLÁGENO DE HUESOS PARA EL
ANÁLISIS DE RADIOCARBONO POR EMA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICO

PRESENTA:

GABRIELA PÉREZ ANDRADE

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CORINA SOLÍS ROSALES



CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO

MAYO, 2016



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.

**Estudio de los indicadores del estado de preservación de
colágeno de huesos para el análisis de radiocarbono por EMA**

por

Gabriela Pérez Andrade

Tesis presentada para obtener el título de

Físico

en la

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Ciudad de México, México. Mayo, 2016

1. Datos del Alumno

Pérez

Andrade

Gabriela

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Física

411070199

2. Datos del tutor

Dra.

Corina

Solís

Rosales

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Jesús Angel

Arenas

Alatorre

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Alejandro

Terrazas

Mata

5. Datos del sinodal 3

Dra.

María Antonieta

Mondragón

Sosa

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Miguel Ángel

Martínez

Carrillo

7. Datos del trabajo

Estudio de los indicadores del estado de preservación del estado de huesos para el análisis de radiocarbono por EMA.

88 p

2016

Agradecimientos

A la Dra. Corina Solís Rosales por su dirección, paciencia y apoyo como tutora durante el tiempo que he sido parte del LEMA.

A mis sinodales, los Doctores Jesús A. Arenas Alatorre, Alejandro Terrazas Mata, Ma. Antonienta Mondragón Sosa y Miguel A. Martínez Carrillo por tomarse el tiempo de leer y corregir este trabajo.

A la Dra. María Rodríguez Ceja, Fis. Arcadio Huerta Hernández y Sergio Martínez González por toda su ayuda en el laboratorio.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca que me otorgó en el marco de los proyectos PAPIIT IG100313 e IG100216. Agradezco también a CONACYT por los recursos otorgados a través de los proyectos 261085,232718, 264245 y 205317.

A mis padres por apoyarme siempre en el camino a alcanzar mis metas.

A mis hermanos por escucharme, consentirme y ser pacientes conmigo.

A mis abuelos, Domingo, Elvira y Esther por su bendición de cada domingo.

A quienes tuve la fortuna de conocer durante la carrera y me han ayudado en mi desarrollo como estudiante y como persona. Sin ustedes no lo habría logrado: Lau, Dario, Armando Jorge, Rafa M., Abuelo, Mady, Roy, Mónica, Edgar, Katia, Josafat, David, Soco, Aline, Juan Carlos, Salvador, Arturo, Eddy, Yurbix, Fer Mendencia, Fer Tapia, Ana, Pamela, Vega, Jimena, Ale Bouzas, Ale Trejo, Sueli, Esteban, Neto, Ito, Carlos, Erika, Citlali, Paulina, Fer Pérez, Emilia, Erick, Ale C, Rafael, Gaby, Jorge Hernández.

Gracias a Dario y Laura por ser mi soporte y aguantar mis quejas y depresiones momentáneas.

A la familia LEMA, porque además de ser un equipo de trabajo, me brindaron su amistad:

Daniel, Lalo, Tiff, Octavio, María, Dra. Corina, Arcadio, Miguel, Sergio, Dulce, Isareli, Javier, Vicky Dr. Efraín y Luis.

Ale, Marianne, Sam y Sammy porque a pesar de la distancia siempre están al pendiente de mí y cada vez que las veo es como si no hubiera pasado un día desde que nos separamos.

A Marianne, Sra. Lety y Sra. Mari. Gracias por echarme porras siempre.

A Mon, Memo y Orlando porque desde aquel verano del 2009 supe que su amistad sería incondicional.

Gracias Alan por creer en mí, por ser como un hermano mayor y cuidarme desde la primera vez que llegué asustada a pedirte ayuda con mi tarea. Sin duda eres la razón por la cual a pesar de los malos ratos no me rendí nunca.

A mi querido Alan

Estudio de los indicadores del estado de preservación de colágeno de huesos para el análisis de radiocarbono por EMA

por

Gabriela Pérez Andrade

Resumen

La datación con radiocarbono por Espectrometría de Masas con Aceleradores posee una gran sensibilidad y rapidez de medición en comparación con las anteriores técnicas. Sin embargo, es costosa. Aunque la cantidad de muestra necesaria para hacer las mediciones es muy pequeña, muchas veces después del tratamiento de las muestras, no se extrae suficiente carbono para obtener un resultado confiable, lo que lleva a la pérdida innecesaria de material. Para evitar este tipo de problemas, los laboratorios de EMA, se han dado a la tarea de buscar la relación entre las características de cada muestra ósea y su contenido de colágeno que indique si esta tendrá suficiente carbono para llevar a cabo todo el proceso.

En algunos estudios dedicados a conocer el estado de preservación de los huesos, se ha hecho uso de técnicas como medición de porosidad, índice de cristalinidad o contexto geológico. No obstante, otros estudios se han centrado en el análisis de los huesos y su colágeno, esperando obtener alguna dependencia útil. Hasta ahora, en la mayoría de esos estudios [1, 2] se ha encontrado una relación entre el contenido de nitrógeno y el rendimiento de colágeno, el segundo considerado como el factor directamente relacionado con la preservación del colágeno.

En este trabajo, se hizo un análisis de la composición de huesos provenientes de diferentes sitios arqueológicos mexicanos utilizando el analizador elemental Vario Cube perteneciente al laboratorio de grafitización del Laboratorio Nacional de Espectrometría de Masas con Aceleradores (LEMA) ubicado en el Instituto de Física de la UNAM, se midieron los porcentajes de contenido de nitrógeno y carbono, su proporción (C/N) y el rendimiento de colágeno de cada muestra, buscando alguna relación entre la información obtenida y también caracterizar las muestras óseas hasta ahora analizadas en LEMA.

Los rendimientos de colágeno de la mayoría de las muestras analizadas son menores a 1 %, valor comúnmente tomado como cota inferior para seguir con el análisis. No obstante, debido al escaso número de muestras disponibles, se decidió seguir con todo el proceso. No se encontraron relaciones obvias entre el rendimiento de colágeno y estos tres parámetros, sin embargo al comparar gráficamente la relación obtenida con la razón C/N, se observó similitud con las investigaciones realizadas en aquellos laboratorios dedicados a la datación de huesos con ^{14}C mediante EMA, concluyendo que si bien no existe un valor definitivo de este parámetro que indique buena preservación de colágeno con seguridad, es probable que exista un rango de valores alrededor del 2.79 (promedio obtenido en este trabajo) relacionado con aquellas muestras cuyos rendimientos de colágeno es mayor al 1 %.

Con el afán de seguir entendiendo más sobre las propiedades de los huesos, se realizó un estudio de las características de algunas muestras cuyas condiciones permitieron la obtención de tres fracciones distintas durante las etapas de la extracción de colágeno: colágeno total, colágeno ultrafiltrado (llamado gelatina UF en [3]) y colágeno insoluble; datándolas posteriormente en LEMA para hacer una comparación entre los resultados y de esa forma asociar sus propiedades con la reproducibilidad o no de las fechas. Encontrar coincidencia de datos bajo ciertas condiciones, indicaría que se podría obtener información valiosa de los huesos que no necesariamente tengan alto rendimiento de colágeno o incluso cuando no sea posible extraerlo.

Los huesos que se utilizaron en esta comparación (19), permiten decir una vez más que la relación C/N y el rendimiento de colágeno, son los factores que más información pueden proporcionar en cuanto al estado de preservación de los huesos. Asimismo, tomando como referencia las muestras analizadas en este trabajo, se obtuvo que un resultado será coincidente si la razón C/N para el colágeno total es mayor a la del colágeno UF indicando la limpieza exitosa de la muestra; aunque no es posible determinar un intervalo definitivo de este parámetro para el colágeno UF, ésta debería situarse en el intervalo de 2.7 a 2.8. Además es preferible que la variación entre las relaciones C/N de las fracciones obtenidas no sea significativa (basándonos en que existen diferencias de hasta 44 unidades). De igual manera el rendimiento de colágeno UF es $\geq 1\%$. Es importante mencionar que para poder generalizar estos resultados, se necesita seguir haciendo pruebas.

Es claro que este es un primer estudio de nuestra región sobre las condiciones en las que debe presentarse una muestra para que sea posible su datación por ^{14}C con EMA y que hay mucho trabajo a futuro que involucra el uso de otras técnicas para un análisis más detallado de estos y otros parámetros que pueden fungir como indicadores del estado de preservación de las muestras.

Índice general

1. Método de datación por ^{14}C	1
1.1. Tasa de producción y distribución de carbono global	3
1.2. Bases de la técnica	6
1.3. Principales variaciones	8
1.3.1. Procedencia de la muestra	9
1.3.2. Composición de la muestra	10
Fraccionamiento isotópico	10
Contaminación	11
Diagénesis	13
1.3.3. Factores estadísticos y experimentales	13
1.3.4. Factores sistémicos	14
Efecto reservorio	15
Efecto de Vries	16
1.4. Curvas de calibración	17
1.5. Tratamiento de datos usando EMA	21
2. Datación de huesos por ^{14}C	24
2.1. Diagénesis en huesos	28
Medición de diagénesis	29
Procesos de cambio	30
Parámetros ambientales	31

Consideraciones adicionales	32
3. Objetivos	33
4. Materiales y métodos	34
4.1. Descripción de las muestras	34
4.2. Extracción de colágeno en el LEMA	36
4.3. Combustión y grafitización	41
4.4. Análisis con EMA	43
4.5. Separador isotópico del LEMA	45
4.5.1. Calibración del sistema	52
Fuente de iones	52
Zona de baja energía	53
Zona de alta energía	54
Detector	54
4.6. Tratamiento de datos de datación con ¹⁴ C	54
5. Resultados y discusión	55
5.1. Relaciones entre parámetros para analizar la preservación de colágeno	55
5.2. Efecto del proceso de gelatinización en las muestras	59
5.3. Datación de diferentes fracciones de hueso	60
5.4. Conclusiones	63
A. Medida de ¹⁴C en términos de actividad	66
B. Datos de las relaciones entre parámetros de preservación de colágeno	68
C. Comparación del factor C/N	72
Bibliografía	74
Índice de figuras	77

Capítulo 1

Método de datación por ^{14}C

Existen diversos métodos que se han utilizado para la datación de materiales. Inicialmente los intereses se enfocaban en investigaciones arqueológicas, sin embargo actualmente el interés se ha expandido a investigaciones relacionadas con la ciencia forense, artes, geología, vulcanología, etc.

El isótopo de ^{14}C fue descubierto en 1937. Los seres vivos incorporan ^{14}C proveniente del medio ambiente (océano, biósfera y sedimentos) a su organismo mediante la alimentación y por esto, antes de su muerte, se considera que la razón entre su contenido de ^{14}C y la del medio es constante. En el momento de su muerte el intercambio termina y dado que este isótopo del carbono obedece la ley de decaimiento radiactivo, su concentración en el organismo comienza a disminuir. Como consecuencia, es posible relacionar información sobre esta cantidad con la edad de un material. Este hecho es la base de la técnica de datación por radiocarbono.

En 1946, Willard Libby determinó que la vida media del ^{14}C era de 5568 ± 40 años y basándose en que este rango podía ajustarse a escalas de tiempo arqueológicas, propuso un método de datación en el que midiendo el número de partículas β emitidas como resultado de los decaimientos del ^{14}C durante un intervalo de tiempo conocido, en una muestra de material orgánico, era posible conocer la cantidad inicial y así determinar un número aproximado de años transcurridos desde su muerte.

En 1951, Libby expuso su primera lista de resultados (edades) usando esta técnica. Años más tarde se hicieron mediciones en las que se encontró que en realidad la vida media del ^{14}C es de 5730 ± 40 años, sin embargo se llegó al acuerdo de que se seguiría usando la vida media propuesta por Libby para no alterar los resultados ya publicados y posteriormente, se haría una corrección para eliminar el error debido a la vida media utilizada inicialmente.

En años siguientes, se instalaron algunos laboratorios dedicados a la datación por ^{14}C alrededor del mundo y en algunos de ellos, se hicieron grandes contribuciones al entendimiento del método. Uno de los principales retos para lograr la optimización de la técnica, ha sido el entendimiento de factores como la variación en la concentración de ^{14}C en la atmósfera, la contaminación de las muestras y las condiciones sujetas a todos los contextos en los que son encontradas. Estas variaciones han provocado constantes cambios y actualizaciones en la técnica, que serán explicados a lo largo de este trabajo.

En general, toda la materia orgánica (huesos, conchas, carbón, semillas, etc.) es "fechaable" usando este método, ya que estos materiales tienen intercambio directo de ^{14}C con la atmósfera. También es posible fechar algunas maderas y plantas que bajo algún tratamiento se convirtieron en materiales de uso cotidiano como textiles o cuerdas. Por otro lado, aunque menos común, también son datados algunos materiales como restos de tejidos blandos, cuernos, piel, papel, pergaminos, marfil, dientes, cabello, sangre, insectos y corales. Algunos sedimentos y suelos también se prestan al uso de la técnica, sin embargo siempre se toma en cuenta que sus fuentes de carbono son muy diversas y difíciles de estudiar. Es importante señalar que no todos los materiales son datados con el mismo éxito. Esto se debe a que el proceso para cada muestra comienza desde la extracción del material del lugar en donde está depositado, hasta el momento de la medición; lo que provoca que existan muchas condiciones, parámetros y factores que pueden variar durante las mediciones y por lo tanto la manera en que afectan los resultados cambia.

1.1. Tasa de producción y distribución de carbono global

El carbono existe en forma de tres isótopos. Dos de ellos estables y uno inestable. En orden de abundancia, primero se encuentra el ^{12}C , el cual constituye el 99 % del total, seguido por el ^{13}C cuya concentración es del 1 %; y finalmente un isótopo inestable del cual existen solamente 1×10^{-12} por cada átomo de ^{12}C : el ^{14}C .

Los isótopos estables del carbono, forman parte de la composición de la Tierra desde su formación primordial, mientras que la formación del ^{14}C puede ser: cosmogénica o antropogénica. El primer tipo, conocido también como la forma natural de formación de ^{14}C , ocurre cuando rayos cósmicos (partículas con energía del orden de TeV) provenientes de supernovas alcanzan a la Tierra y producen neutrones térmicos que al interactuar con el nitrógeno atmosférico, dan lugar a la reacción nuclear 1-1 que da como resultado la formación del radioisótopo



Se han hecho cálculos y simulaciones que permiten conocer de una manera casi exacta que la tasa de producción de radiocarbono debida a la fragmentación de rayos cósmicos es de 2.2 átomos $\text{seg} \times \text{cm}^{-1}$ ([4]).

El segundo caso de formación de ^{14}C (antropogénico o artificial) se refiere principalmente a la producción de neutrones térmicos como consecuencia de los ensayos nucleares efectuados entre 1950 y 1960, esto creó un efecto similar al de los rayos cósmicos y por lo tanto el aumento en la tasa de ^{14}C atmosférico. Se sabe que se produjo alrededor del doble de átomos de ^{14}C entre 1963 y 1965. El nivel del carbono artificial producido por las bombas atómicas en el hemisferio norte alcanzó su punto máximo en 1963, mientras que en el hemisferio sur alrededor de 1965.

Debido a su mecanismo de formación, la cantidad de ^{14}C producido es afectada por la intensidad y cantidad de neutrones térmicos presentes en la atmósfera. Estos a su vez, se ven afectados por el efecto de blindaje causado por el campo magnético terrestre, el cual desvía algunos de los rayos cósmicos incidentes de la superficie de la Tierra, implicando una variación

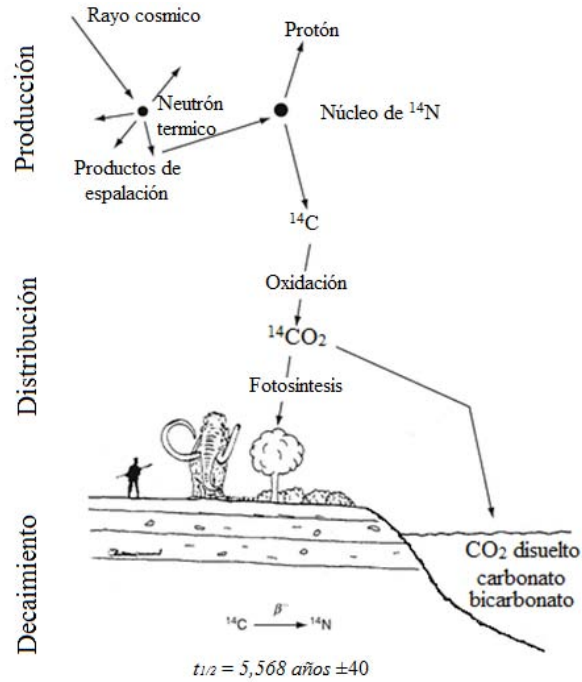


Figura 1-1: Esquema del ciclo del carbono [5]

geográfica de la distribución de producción de ^{14}C , es de esperarse que cuanto más alto sea, mayor cantidad de rayos cósmicos se deflectan, disminuyendo su concentración. Sin embargo, debido al relativamente corto periodo de tiempo en el cual la atmósfera terrestre distribuye las moléculas de $^{14}\text{CO}_2$ por toda la superficie, el factor de variación geográfica es despreciable.

Otro elemento que ha afectado los niveles de ^{14}C atmosféricos, se conoce como el *efecto Suess*. Éste se debe a la quema de combustibles fósiles ocurrida a partir la revolución industrial y que como consecuencia produjo una disminución en la actividad del ^{14}C atmosférico.

Al producirse el ^{14}C por alguna de las dos maneras, se forma monóxido y dióxido de carbono (reacciones 1-2 y 1-3) que posteriormente se mezcla en los océanos y la biósfera.



Una vez en la superficie, el $^{14}\text{CO}_2$ entra en el ciclo de distribución de carbono entre los diferentes reservorios existentes en la Tierra. Una de las clasificaciones de reservorios es: atmósfera, biósfera, hidrósfera y sedimentos [5].

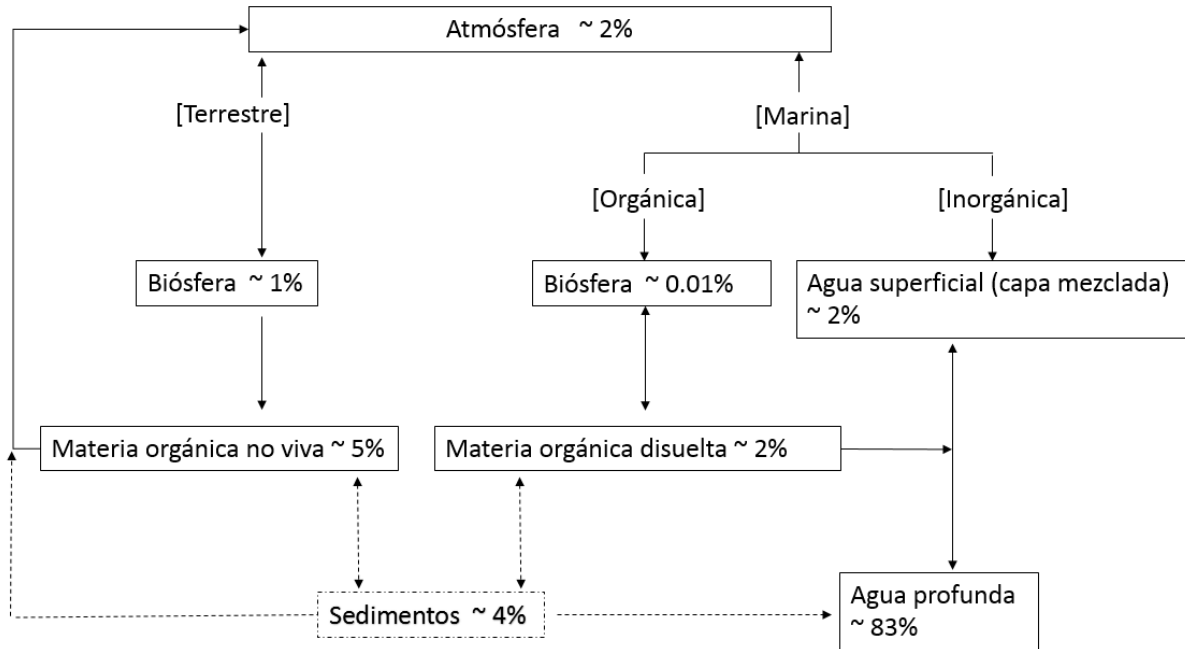


Figura 1-2: Distribución general del carbono en los diferentes reservorios. Esquema obtenido de [5]

En el figura 1-2, puede observarse que existe una gran diferencia entre el porcentaje de ^{14}C en el agua profunda y los otros reservorios. Esta diferencia es importante debido a que la gran concentración y el elevado tiempo de residencia del isótopo (~ 1000 años) suele actuar como una compensación a posibles variaciones en la concentración en la superficie terrestre. Sin embargo, se ha encontrado que al ser un factor importante en las variaciones climáticas en la Tierra, ha provocado cambios en el ^{14}C atmosférico principalmente durante las glaciaciones, concluyéndose que tasas de ventilación reducidas en el océano profundo, provocan aumento en la concentración de ^{14}C en la atmósfera, mientras que ventilaciones altas resultan en una disminución del mismo [3]. Además del decaimiento radiactivo, se deben entender los “efectos de alteración” que se refieren a la manera en la que la concentración de carbono se comporta, esto es, estudiar la forma global y local de interactuar entre los principales reservorios de

carbono. Este estudio lleva a la generación apropiada de curvas de calibración que tomen en cuenta la mayoría de factores posibles que pudieran interferir o afectar la precisión de los resultados.

1.2. Bases de la técnica

Existen dos maneras de calcular edades usando radiocarbono, la primera es midiendo las partículas beta resultantes del decaimiento del ^{14}C y la segunda es mediante el conteo de la fracción $^{14}\text{C} / ^{12}\text{C}$ con EMA. Ambas técnicas están basadas en que la concentración de ^{14}C en los organismos empieza a disminuir al momento de su muerte mediante la ley de decaimiento radiactivo, por lo cual puede calcularse el tiempo a partir del cese de intercambio (edad radiocarbono) de la siguiente manera:

$$T = 8033 \ln \left[\frac{A}{A_0} \right] \quad (1-4)$$

donde A es la actividad del ^{14}C al momento de la medición, A_0 es la actividad inicial de ^{14}C al tiempo de la muerte t_0 , $T_{1/2} / \ln 2 = 8033$ años donde $T_{1/2} = 5568$ años es la vida media calculada por Libby. Aunque para tener un cálculo exacto se necesitaría un valor de A_0 constante, se ha tomado como referencia en las mediciones de edades para la actividad de un tipo de madera que creció en los años ochentas [3].

En principio para que la técnica funcione, se requiere hacer diversas suposiciones relacionadas con la concentración de ^{14}C atmosférico y la existencia de equilibrio entre concentraciones en los reservorios. Bajo ciertas circunstancias, en particular si la tasa de producción fuera casi constante, habría un equilibrio dinámico entre la formación y el decaimiento del mismo, lo que llevaría a una concentración constante de ^{14}C en la atmósfera. Sin embargo, estas suposiciones no son del todo ciertas debido a la gran cantidad de factores que afectan en la producción y distribución del radioisótopo (sección 1.3) además particularmente en la técnica de EMA, se toman en cuenta también las fracciones de los isótopos estables ^{13}C y ^{12}C , por lo que se deben hacer más correcciones de acuerdo a estándares internacionales o materiales de referencia.

Por todos estos factores, existen diferentes hipótesis con el propósito de que la técnica sea válida [6, 7].

- La producción de ^{14}C en la atmósfera y el intercambio entre reservorios han sido constantes, lo cual lleva a su vez a asumir que la concentración de ^{14}C en la atmósfera siempre ha sido la misma y es igual a la de la biósfera. En consecuencia, cada punto en la biósfera tiene la misma concentración de ^{14}C a un momento dado.
- La muerte de un ser vivo marca el punto en el que el intercambio de ^{14}C entre éste y el ambiente cesa. A partir de ese momento, el único factor que afecta la concentración del radioisótopo es su decaimiento.
- La actividad del ^{14}C contenido en un material durante su formación ha sido siempre la misma y está definida por una muestra de ácido oxálico distribuida por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST por sus siglas en inglés), que es un material de referencia estándar.
- Las actividades de ^{14}C deben ser corregidas por fraccionamiento isotópico (sección 1.3.2) basándose en una medida de la razón $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$.
- Las edades radiocarbono están dadas en años aP (antes del presente), es decir a partir de 1950 DC.

Además, una de las principales consideraciones que se deben tomar en cuenta es el ya visto error del 3 % en la vida media usada por Libby. Como ya se mencionó, se hacen correcciones a los datos tratados actualmente para corregir el error sin afectar los ya publicados. La corrección debida al error en la vida media del ^{14}C , hecha a las edades calculadas actualmente es la mostrada en la ecuación 1-5.

$$t_{5730} = 1.03 \times t_{\text{Libby}} \quad (1-5)$$

En las siguiente sección (1.3), nos encargaremos de enlistar las principales variaciones que se deben tomar en cuenta respecto a estas suposiciones.

1.3. Principales variaciones

Como hemos visto, aunque la técnica de datación por ^{14}C está basada en un fenómeno bien conocido (decaimiento radiactivo), ésta también puede presentar una gran diversidad de dificultades debido a que generalmente, las muestras no cumplen con todas las suposiciones que se han propuesto (capítulo 1.2) para que el método sea completamente ideal.

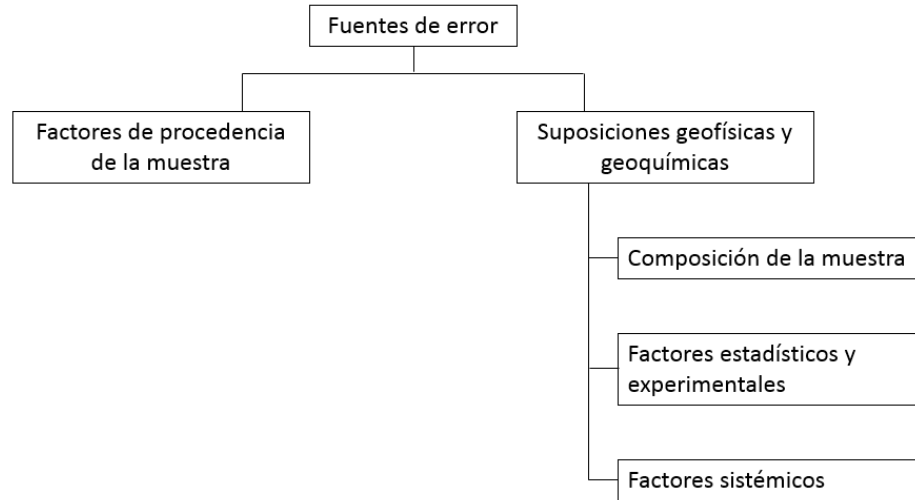


Figura 1-3: Principales fuentes de variación en los cálculos de datación con radiocarbono [5]

Las variaciones respecto a estas hipótesis tienen diferentes fuentes, algunas están relacionadas con la procedencia de la muestra y algunas con los aspectos geofísicos y geoquímicos de la misma (Esquema 1-3). La evaluación de la exactitud de un resultado de edad radiocarbono, se fundamenta en la cantidad de hipótesis que cumple, por eso se sugiere que una buena manera de comprobar los resultados es datando diferentes objetos encontrados en el mismo contexto o en otro caso, hacer dataciones de diferentes fracciones de una misma muestra. La segunda opción se piensa como la más adecuada. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen muchos trabajos en los que se haga, debido a que lleva mucho tiempo y, al separar las fracciones, se encuentran aun más dificultades que pueden estar relacionadas por ejemplo con el tamaño de la muestra. Tener una muestra de tamaño considerable en la técnica es de gran importancia para su manipulación, y aunque el uso de EMA ha lidiado y desaparecido algunos de estos impedimentos comparada

con la técnica convencional de datación con ^{14}C , todavía no se conoce una manera efectiva de eliminar todos.

Como se muestra en la figura 1-3, una de las posibles clasificaciones de los factores que influyen en la precisión y exactitud de los resultados son: los *Factores de procedencia de la muestra* que relacionan la integridad de la muestra con el contexto en el que se encontró; la *composición de la muestra* que están asociados principalmente con su contaminación y efectos del fraccionamiento (secciones 1.3.2 y 1.3.2); *factores estadísticos y experimentales* que abarcan todos las cuestiones relacionadas con la obtención y tratamiento de datos para la datación y *factores sistémicos* refiriéndose a las variaciones debidas a efectos de reservorio o de Vries.

1.3.1. Procedencia de la muestra

El contexto en el que las muestras son encontradas es de suma importancia ya que, generalmente, este es un factor decisivo para evaluar si una muestra ha sido posicionada correctamente en un rango de tiempo arqueológico o evento histórico. Aunque conocer por completo el contexto es imposible debido a la variedad de condiciones y tipos de sitios arqueológicos, establecer una relación entre la muestra y algún evento o fenómeno histórico es esencial para realizar un análisis completo de los datos de la medición de ^{14}C . Frederick Johnson (1965:776) estableció que las edades radiocarbono únicamente están relacionadas directamente con la muestra fechada, mas el arqueólogo tiene como tarea establecer y justificar la relación entre la edad obtenida y el contexto en el que fue encontrada.

Durante el tiempo que se ha estado usando la técnica de datación con ^{14}C , se ha encontrado que una gran porción de valores erróneos de edades radiocarbono se deben a una asociación incorrecta entre las muestras y el ambiente arqueológico, geológico o histórico. Los principales motivos de estas asociaciones erróneas son perturbaciones previas en la zona donde fueron encontradas las muestras, provocadas por seres humanos, animales o formación de turba.

Los procesos de formación de turba se refieren a la descomposición de material orgánico con lo que se transforma en carbón mineral. En zonas como los polos de la Tierra, el suelo está severamente afectado por estos procesos ya que se forman capas de 10 a 50 cm aproximadamente

cada 100 años, esto lleva a la creación y combinación de distintas capas durante el paso del tiempo y en consecuencia la información extraída de ese contexto puede no coincidir con la datación de algún material encontrado ahí. Además, en zonas donde pudo haber asentamientos de animales por diferentes periodos de tiempo, la integridad del contexto arqueológico es dudosa, por ello al ser identificadas estas situaciones, se debe evitar hacer la correlación entre el lugar y la edad de la muestra encontrada [5].

1.3.2. Composición de la muestra

Existen varios tipos de materiales que pueden ser fechados, la composición de cada uno de ellos es un factor que debe tomarse en cuenta ya que las diferencias en sus composiciones, llevan a diferentes tipos de contaminación o degradación. Se ilustrarán tres casos importantes asociados a la composición de la muestra.

Fraccionamiento isotópico

Ocurre debido a que el metabolismo de los seres vivos incorpora primero el isótopo más ligero del carbono. De esta manera, el ^{12}C es absorbido primero, seguido por el ^{13}C y finalmente el ^{14}C . Esto lleva a concentraciones isotópicas diferentes entre un organismo y la atmósfera en donde se desarrolla y a su vez, entre organismos que vivieron en el mismo lugar de la biósfera en el mismo periodo de tiempo. Se sabe que el efecto del fraccionamiento en la cantidad de enriquecimiento en los valores de ^{14}C es aproximadamente el doble que sobre los de ^{13}C , sin embargo una vez fijada la concentración de ^{13}C , ésta se mantiene constante debido a la estabilidad del isótopo, por lo que es posible calibrar la relación $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ a un valor acordado y de acuerdo a ese valor, hacer una calibración proporcional para la actividad del ^{14}C :

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{estandar}}} - 1 \right] \times 10^3\text{‰} \quad (1-6)$$

Se ha tomado como convención, que la normalización debida a este fenómeno se haga tomando como valor de referencia una escala común de $\delta^{13}\text{C}$ (ecuación 1-6). Todos los valores

deben ser corregidos de acuerdo al fraccionamiento del estándar PDB (Belemnitella Americana) el cual arroja valores de $\delta^{13}\text{C} = -25\text{‰}$. Tomando en cuenta esto, la actividad corregida para la muestra está dada por:

$$\frac{A_{\text{corregida}}}{A_{\text{medida}}} = \left[\frac{1 + (-25/10^3)}{1 + (\delta^{13}\text{C}/10^3)} \right]^2 \quad (1-7)$$

Y expresada en términos del tiempo, obtenemos

$$t_c - t_m = 16(\delta^{13}\text{C} + 15)_{\text{años}} \quad (1-8)$$

Lo cual quiere decir que valores mayores a -25‰ en el $\delta^{13}\text{C}$ hacen que el resultado corregido arroje edades más viejas, mientras que el fraccionamiento correspondiente a 1‰ provoca una diferencia de 16 años en la edad. Con esto se puede concluir que para $\delta^{13}\text{C}$ menores a -25‰ arrojan edades corregidas más jóvenes que las medidas.

Contaminación

Se le llama contaminación a todo aquel carbono adherido a la muestra, que sea ajeno a ella. Reconocer y eliminar la contaminación es uno de los retos más difíciles involucrados en la calidad de los resultados, esto por la variedad de fuentes de contaminación existentes y el grado de penetración que pueden tener sobre la muestra [6]. Para eliminarla, se hacen diferentes lavados para ir llegando hasta los niveles más internos.

La relación que describe el efecto de la contaminación en la actividad del ^{14}C de la muestra, está en términos de la actividad medida A_M , la de la muestra A_m , la del contaminante A_c y la cantidad del contaminante f . Ésta también puede ser expresada en términos de tiempo usando la ley de decaimiento radiactivo 1-4, tomando como A_0 la actividad moderna.

$$A_M = fA_c + (1 - f)A_m \quad (1-9)$$

Existen dos casos de posible contaminación en las muestras. Cuando la muestra retiene contaminantes tan viejos que su actividad puede considerarse nula (i.e. $A_c = 0$), la actividad

total medida arroja resultados que llevan a tener un desvío total de aproximadamente 80 años por cada 1 % de contaminante. Esto quiere decir que la edad resultante sería más vieja de lo que es en realidad. En el caso en el que la muestra es contaminada con carbono moderno, se toma $A_c = A_0$ por lo que la muestra arroja un resultado aparentando ser más joven de su edad real.

Debido a que este trabajo se centra en huesos, expondremos los tipos de contaminantes en material orgánico. Existen dos etapas en las que la muestra puede ser contaminada: *antes o durante su formación* (Tablas 1-4 y 1-5) y *después de su formación*.

CONTAMINACIÓN NATURAL ANTES DEL MUESTREO

	Antes o durante la formación	Después de la formación
Muestra orgánica	Materia orgánica fósil Carbonato fósil	Infiltración orgánica (Humus) Penetración de raíces. Carbonatos secundarios Mezclas con otros materiales
Muestra de carbonatos	Carbonato fósil Materia orgánica fósil	Carbonato secundario

Figura 1-4: Principales fuentes de variación en los cálculos de datación con radiocarbono (antes de extraer la muestra) [7]

Contaminantes como la turba ¹ y otros materiales de tipo vegetal que se incorporan a la muestra, pueden provocar "envejecimiento" en los resultados de su edad. Por otro lado, los carbonatos fósiles pueden contaminar la materia orgánica debido a que están contenidos en el suelo donde suelen encontrarse las muestras.

CONTAMINACIÓN NATURAL DURANTE/DESPUÉS DEL MUESTREO

	Durante el muestreo	Después de la formación
Todos los tipos	Mezcla durante la colecta	Sustancias preservantes. Materiales para empaçado

Figura 1-5: Principales fuentes de variación natural en los cálculos de datación con radiocarbono (durante y después la extracción de la muestra) [7]

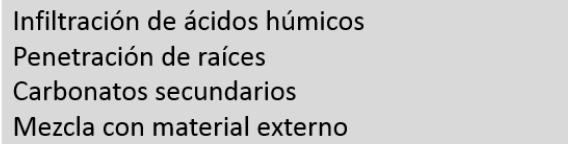
En el caso de la formación de la muestra (figura 1-6), existen los ácidos húmicos que son adsorbidos por ella mediante por ejemplo, agua de lluvia que los dirige a través de la estructura.

¹ Carbón ligero, esponjoso y de aspecto terroso que se forma en lugares pantanosos debido a la descomposición de restos vegetales.

Este tipo de contaminantes generalmente son expulsados con un baño ácido. En el caso de la turba, las raíces mezcladas son un problema ya que el único método conocido hasta ahora es su eliminación mediante microscopios y pinzas, sin embargo es un proceso que lleva mucho tiempo.

Los carbonatos secundarios libres en la atmósfera o en aguas superficiales, pueden también adherirse a las muestras, sin embargo estos se eliminan mediante baños en sustancias básicas. Existen otro tipo de contaminantes más externos que provienen por ejemplo, de organismos que habitan el suelo o vegetación cercana. Es tarea del personal del laboratorio hacer la eliminación de todos los contaminantes posibles sin dañar la muestra.

CONTAMINACIÓN DESPUÉS DE SU FORMACIÓN



- Infiltración de ácidos húmicos
- Penetración de raíces
- Carbonatos secundarios
- Mezcla con material externo

Figura 1-6: Principales fuentes de contaminación en involucradas datación con radiocarbono después de su formación [7]

Diagénesis

La diagénesis es comúnmente confundida con contaminación, sin embargo, son conceptos distintos: se refiere a alteraciones a nivel molecular de los materiales a fechar. Generalmente los contaminantes se adhieren a las muestras debido al largo tiempo que llevan en cierto ambiente y en este caso, se deben hacer valoraciones de qué tan íntegra sigue la composición de la muestra y hacerse correcciones de acuerdo a esto ya que no hay un método específico para eliminar sus efectos.

1.3.3. Factores estadísticos y experimentales

La estadística de datos es un factor que puede introducir errores relacionados con manejo de desviaciones estándar o la relación entre datos y curvas de calibración.

Para eliminar estos errores, se hacen diversas mediciones de una misma muestra para comparar desviaciones estándar y reducir errores. En la figura 1-7 se observa un ejemplo de esto. Aunque los errores de este tipo se han reducido con la mejora de los dispositivos y técnicas utilizados a través del tiempo, es imposible representar una edad radiocarbono asociada a una sola edad calendario, éstas siempre deben ser representadas con su respectivos factores 1σ y 2σ .

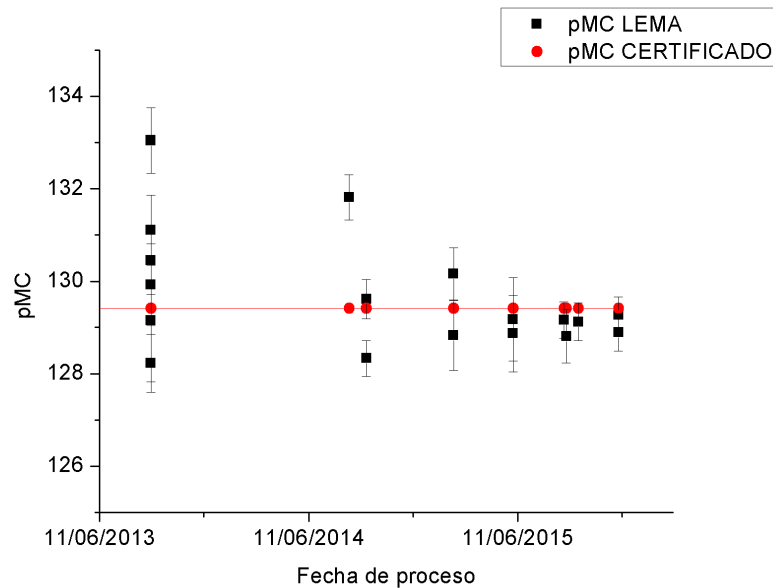


Figura 1-7: Ejemplo de la repetición de una muestra en LEMA. En rojo se muestran los valores certificados mientras que en negro los medidos.

Los errores experimentales, por su parte, son aquellos que se relacionan con los instrumentos de medición o equivocaciones accidentales del personal de laboratorio que muchas veces no son detectadas y por lo tanto no se eliminan.

1.3.4. Factores sistémicos

Son llamadas así aquellos efectos que llevan a la modificación de las hipótesis principales de la teoría de datación con ^{14}C ; pueden ser de dos tipos: *efecto de Vries* o *efecto reservorio* y para eliminarlos deben hacerse calibraciones y correcciones. Estos no involucran ningún problema

que sea secuela a la composición de la muestra.

Efecto reservorio

En caso de que los materiales a fechar no obtengan el ^{14}C de lugares cuya concentración está en equilibrio con la atmósfera, debe tomarse en cuenta el *efecto reservorio*, que se origina debido a que el enriquecimiento isotópico en las muestras es diferente al correspondiente a la atmósfera.

Existen diferentes reservorios que provocan este efecto [8]:

- *Marino*. En el océano, se tiene un valor de $\delta^{13}\text{C} = 1\text{‰}$ lo cual hace una diferencia con la atmósfera de 26‰ y a su vez, una diferencia de 52‰ en $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ (ya que se considera el doble que la δ^{13}). Por lo tanto, la actividad del ^{14}C en el océano sería de 152 % comparado con la atmósfera [9]. El ^{14}C en el agua profunda tiene más tiempo para decaer por lo cual su actividad es menor a la del agua superficial.
- *Agua dulce*. Éste se debe principalmente a la disolución de carbonatos geológicos cuyo contenido de ^{14}C es casi nulo debido a su vejez. También puede ser provocado por los ácidos húmicos del suelo o en algunos casos el almacenamiento de agua por temporadas (acuíferos).
- *Volcánico*. En los alrededores de los volcanes, la liberación de fumarolas que contienen CO_2 provocan la disminución de actividad de ^{14}C . Para corregir este efecto se hacen mediciones de la concentración de boro en la región ya que este también es liberado de forma estequiométrica [10].
- *Agua pesada*. Hay zonas en donde ocurre la disminución de ^{14}C en agua dulce debido a la disolución de biocarbonatos y carbonatos en ella, lo que lleva a la incorporación de metales como calcio o magnesio, lo cual produce que el agua se vuelva más "pesada". Es por ello que en este caso el efecto reservorio se llama *de agua pesada*. Esto se da generalmente en zonas donde hay piedra caliza y arenisca.

La corrección a este efecto se hace restando la edad del reservorio de las medidas hechas a la muestra. Las edades de los reservorios generalmente varían localmente, por lo que es importante calcularla en el lugar de donde se obtuvo la muestra.

Efecto de Vries

Éste fue observado por de Vries en 1958 y fue llamado también *de corto plazo*. Se refiere a aquellas perturbaciones que causan algunas de las anomalías en las curvas de calibración discutidas en la sección siguiente. Se han visto importantes relaciones entre los cambios en la modulación de viento solar y ciclos de manchas solares de 11 años, con el flujo de rayos cósmicos incidentes en la Tierra, a las que se han atribuido estas variaciones. Sin embargo, se ha logrado un mejor ajuste de los datos mediante la correlación de las variaciones en la actividad de ^{14}C con el índice de reflexión solar ².

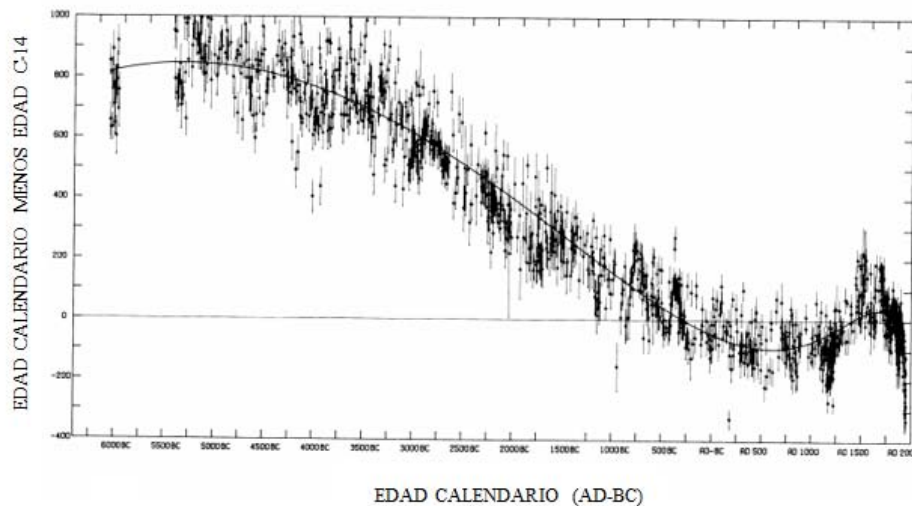


Figura 1-8: Variaciones en la tendencia sinusoidal, atribuidas al efecto de Vries. Relación de ^{14}C y edad calculada con dendrocronología de muestras de madera [11].

² Fracción de la energía solar incidente que es reflejada por la superficie de la Tierra. Aunque no se conoce la causa de estas variaciones con exactitud, es cierto que este efecto influye en la exactitud y precisión de los resultados de edades medidas por radioacarbono [5]

1.4. Curvas de calibración

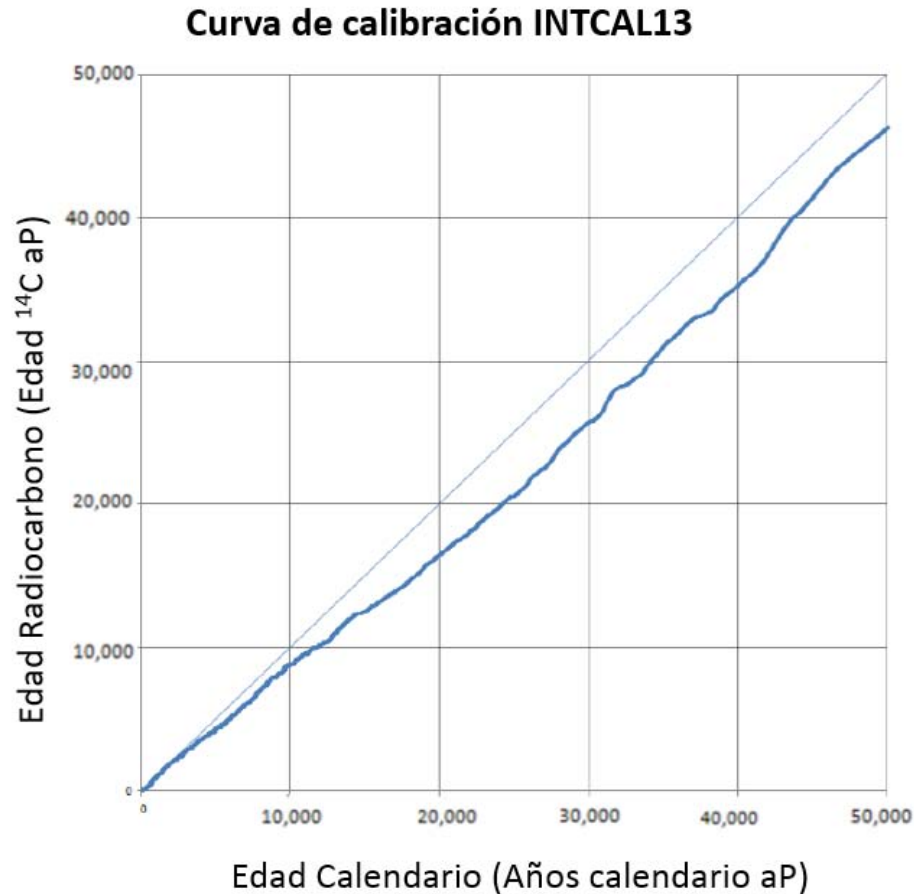


Figura 1-9: Versión más reciente (del año 2013) de la curva de calibración para relacionar edades aP con edades radiocarbónico.

Por la gran cantidad de variaciones en la producción e incorporación de ^{14}C en los organismos (secciones 1.1 y 1.3), se han elaborado curvas de calibración adecuadas que dan una guía al análisis de datos para obtener los mejores resultados, asimismo es necesario establecer una serie de calibraciones específicas por cada fuente de error.

El método más utilizado para generar las curvas de calibración correspondientes a radiocarbónico, es mediante la dendrocronología. Algunos árboles registran patrones de anillos anuales con lo que es posible determinar su edad. Debido a que se supone la concentración de la atmós-

fera igual a la de los organismos vivos a un momento dado, si se determina la concentración de ^{14}C en cada uno de los anillos, es posible hacer un registro anual de concentraciones de ^{14}C .

La primera curva fue hecha por Hans Suess y en ella se dio cuenta que la diferencia entre edades calendario y edades radiocarbono fue clara. En la primera sección de la curva, cuyo eje de las abscisas corresponde a la edad calendario y en el eje de las ordenadas la edad radiocarbono, pudo observarse un comportamiento sinusoidal con un periodo de aproximadamente 9000 años. Sobrepuestos a esta tendencia, también se notaron ciertos "meneos" cuya duración en edad calendario es pequeña pero en edad radiocarbono tienen amplitudes de hasta décadas 1-8. Estas variaciones se atribuyeron a los cambios en la acción de los rayos cósmicos [6].

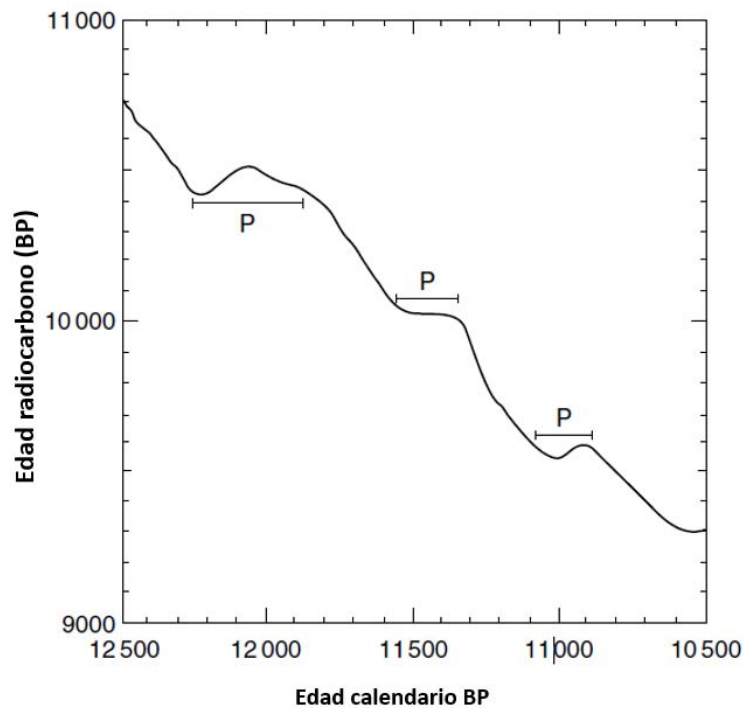


Figura 1-10: Edades radiocarbono contra edades calendario del periodo de 9000-11000 ^{14}C años aP. Esta curva está basada en muestras provenientes de lagos, corales, sedimentos marinos y anillo árboles fechadas por radiocarbono. Cada una de esas muestras también fue fechada independientemente para obtener una comparación directa entre edades radiocarbono y edades calendario. Pueden observarse ciertas "mesetas" denotadas con la letra P en 10 400, 10 000 y 9 600 años ^{14}C . Cualquier fecha que caiga en estas mesetas, tendrá rangos de algunos cientos de años [12]

Otra de las posibles razones de las variaciones en las curvas de calibración (además de los cambios por acción humana), podrían ser ciertos cambios en la circulación del ^{14}C proveniente del océano, hemos dicho ya que este es el reservorio de ^{14}C más grande, por lo que estas modificaciones llevarían a un aumento o disminución de la liberación de CO_2 y por lo tanto la alteración en los niveles de ^{14}C en la atmósfera [13].

En los años posteriores, se han hecho mejoras a las primeras curvas de calibración y desde entonces se han ido mejorando en diversos laboratorios (Belfast, Groningen, Heidelberg, Pretoria, Seattle y Tucson [12]), añadiendo a la información de radiocarbono en anillos de árboles, mediciones en conchas, varvas ³ y algunos otros estudios. Debido a que en general no puede asociarse uno a uno la edad radiocarbono con la edad calendario, éstas son expresadas en términos de intervalos de probabilidad y suelen darse en términos de 1σ (68 %) y 2σ (95.4 %) (figura 1-10).

Es importante mencionar que también existe una incertidumbre asociada con la curva de calibración incluida en los cálculos al momento de dar los intervalos probables. Además, deben tomarse en cuenta factores que afectan los resultados al momento de medir. Estos pueden estar relacionados con el método utilizado o el laboratorio donde se realizan los cálculos, por ejemplo, la radiación de fondo, la precisión de los instrumentos utilizados, etc.

En resumen, existen una serie de convenciones tomadas para reportar los resultados de dataciones con ^{14}C [6]:

- Todos los resultados deben ser reportados en años "antes del presente" (aP), tomando como presente a partir del año 1950.
- La vida media usada para calcular los resultados es la calculada por Libby (5568 años).
- Se realiza una normalización debida a fraccionamiento isotópico tomando como referencia $\delta^{13}\text{C} = -25\text{‰}$.

³ Sedimento formado por asociaciones de láminas en las que alternan niveles más claros (limosos o arenosos) con otros más oscuros (arcillosos), característico de medios lacustres, y cuyo origen va ligado a los cambios climáticos estacionales.

- Se toma como actividad moderna a una proporción de la actividad de uno de los estándares de ácido oxálico, proporcionado por el Departamento Nacional de Estándares de los Estados Unidos.
- Se debe reportar un error de $\pm 1\sigma$.
- Si el término de error es mayor a ± 50 años radiocarbono, se hace un redondeo a los 10 años más cercanos. Si el error es menor, se redondea a los 5 años radiocarbono más cercanos.

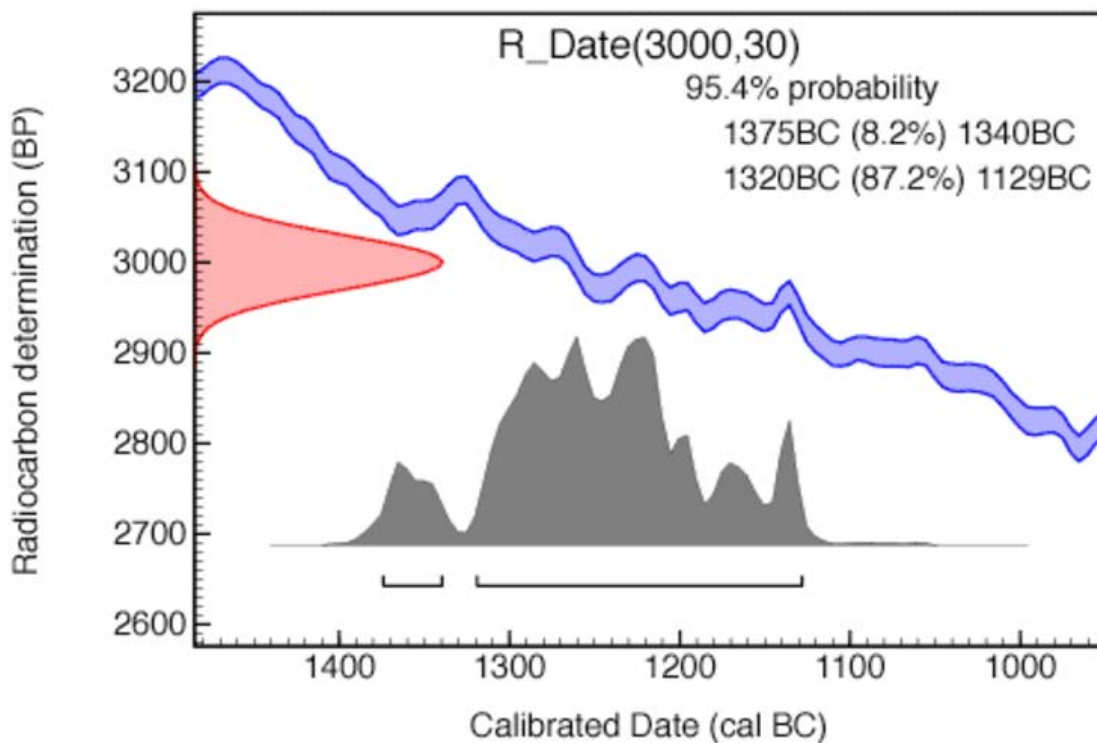


Figura 1-11: Imagen ilustrativa de la forma de calibración con el programa OxCal usado en LEMA (<https://c14.arch.ox.ac.uk/embed.php?File=oxcal.html>). El eje de las abscisas representa la edad calibrada y el eje de las ordenadas la edad radiocarbono. En color azul se observa la curva de calibración, es importante notar que esta tiene cierta anchura correspondiente a la desviación estándar de la misma. La distribución normal a la izquierda en color rojo representa el dato ingresado al programa en edad radiocarbono (con 1σ y 2σ), mientras que en gris se observa una gráfica con diversos "picos" que representan los rangos de probabilidad entre los que puede estar la edad calibrada real.

1.5. Tratamiento de datos usando EMA

Las edades radiocarbono de una muestra se miden de acuerdo con la siguiente ecuación

$$\text{Edad radiocarbono} = -T \ln F \quad (1-10)$$

en donde T es la vida media de Libby y F es la fracción de carbono moderno que contiene la muestra (Ecuación 1-11)

$$F = \frac{(^{14}\text{C}/^{13}\text{C})_{m[\delta^{13}\text{C}=-25]}}{(^{14}\text{C}/^{13}\text{C})_{1950[\delta^{13}\text{C}=-25]}} \quad (1-11)$$

Aunque los principios de las mediciones para datación con radiocarbono están basadas en medidas de actividad ⁴, en espectrometría de masas con aceleradores se cuentan isótopos uno a uno, tomando en cuenta que medir la actividad específica de ¹⁴C en una muestra es proporcional a medir el número de isótopos de ¹⁴C en relación al total y que en general, la concentración de ¹³C y ¹⁴C es mucho menor a la de ¹²C (ecuación 1-12 [15]).

$$\frac{N(^{14}\text{C})}{N(^{12}\text{C}) + N(^{13}\text{C}) + N(^{14}\text{C})} \sim \frac{N(^{14}\text{C})}{N(^{12}\text{C}) + N(^{13}\text{C})} \sim \frac{N(^{14}\text{C})}{N(^{12}\text{C})} \quad (1-12)$$

En primer lugar, se debe tomar en cuenta que la gran cantidad de eventos que se detectan en EMA, permite hacer un análisis estadístico de datos. Es importante que en las técnicas empleadas puedan incluirse y analizar estándares ⁵ y blancos ⁶ para aplicar las normalizaciones adecuadas y eliminar el ruido de fondo. En primer lugar todas las medidas incluyendo los estándares y blancos, deben ser normalizadas a cierto valor hipotético "absoluto" el cual sería su relación ¹⁴C / ¹²C si la actividad del ¹⁴C en 1950 tuviera un $\delta^{13}\text{C}=-25\text{‰}$. Para los ácidos oxálicos ⁷ esta corrección está dada por la ecuación 1-13.

⁴ Se puede encontrar una explicación detallada de este tipo de mediciones en [14].

⁵ Materiales cuya edad ya se conoce y en base a los cuales se hacen correcciones

⁶ Materiales que carecen de carbono, usados para hacer mediciones del fondo del sistema de EMA para eliminar errores sistemáticos.

⁷ Estándares proporcionados por el buró de estándares extraído de una muestra de melasa de remolacha francesa, se usaba primero el I sin embargo debido a que se agotó, se introdujo el II.

$$\left(\frac{^{14}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{1950[-25]} = 0.95 \left(\frac{^{14}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{OXAI}[-19]} = 0.7459 \left(\frac{^{14}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{OXAI}[-25]} \quad (1-13)$$

Donde los subíndices en corchetes indican el uso de la medida corregida por fraccionamiento isotópico $\delta^{13}\text{C}$ con la ecuación 1-6. La expresión 1-13 se usa para obtener el denominador en 1-11. Las constantes se explican en el apéndice A. En el caso de medir $^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$ y tomando en cuenta el estándar PDB ⁸, la relación $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ de una muestra cualquiera está dada por la ecuación

$$\left(\frac{^{14}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_m = \left(\frac{^{14}\text{C}}{^{13}\text{C}}\right)_m \left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_m = \left(\frac{^{14}\text{C}}{^{13}\text{C}}\right)_m \left(1 + \frac{\delta^{13}\text{C}_m}{1000}\right) \left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{PDB}} \quad (1-14)$$

En donde el subíndice m se refiere a la muestra. Para el numerador en 1-11, mediante la expresión 1-15 se hace la corrección a la muestra con cualquier valor de fraccionamiento para obtener aquel valor cuya $\delta^{13}\text{C} = -25$.

$$\left(\frac{^{14}\text{C}}{^{13}\text{C}}\right)_{m[-25]} = \left(\frac{^{14}\text{C}}{^{13}\text{C}}\right)_{m[\delta]} \left[\frac{1 - \frac{25}{1000}}{1 + \frac{(\delta^{13}\text{C})_m}{1000}} \right] \quad (1-15)$$

Se han desarrollado programas de análisis de datos de concentraciones en diferentes laboratorios. Los tipos de errores sistemáticos que buscan eliminarse con este tipo de programas incluyen desviaciones en el tiempo de medida, diferencias en las corrientes usadas u obtenidas y distorsiones en la relaciones isotópicas debidas a eventos no detectados. Generalmente los programas muestran gráficas en donde se puede ver las relaciones $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en función del tiempo de medida o la corriente detectada, de esta manera se pueden observar anomalías que indiquen posibles errores.

Además, para la eliminación de fondo se mide la relación $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ del material blanco y se resta de la medida de la muestra a analizar (ecuación 1-16). Posterior a esta corrección y la de fraccionamiento isotópico, se debe hacer la normalización mediante el cálculo de las relaciones isotópicas correspondientes a los materiales estándar. Es importante tomar en cuenta que sí existe gran diferencia entre las cuentas de materiales estándares, puede haber errores externos

⁸ Estándar Pee Dee Belemnite basado en un fósil del cretácico.

que estén modificando estas relaciones.

$$R_f = \left(\frac{^{14}\text{C}}{^{12}\text{C}} - \langle \frac{^{14}\text{C}}{^{12}\text{C}} \rangle_{blk} \right) \left[\frac{0.975}{1 + \delta^{13}\text{C}/1000} \right]^2 \quad (1-16)$$

Con esta información, se obtiene entonces la relación isotópica necesaria para obtener la edad radiocarbono.

$$Fm = \frac{100}{0.7459} \left(\frac{R_f}{\langle R_f \rangle_{est}} \right) \quad (1-17)$$

Debido al tipo de tratamiento que se le da a los datos, la incertidumbre total de la muestra debe tomar en cuenta la estadística tanto de la muestra como la de los blancos y los estándares. Los resultados entonces son presentados como datos en una tabla de forma que puedan ser analizados en los programas correspondientes a radiocarbono (OxCal en caso del LEMA).

Capítulo 2

Datación de huesos por ^{14}C

El hueso está compuesto por materia orgánica e inorgánica. Aunque las proporciones de estos tipos de materiales son variables entre especies e individuos, se considera que aproximadamente dos tercios del material es inorgánico en forma de hidroxiapatita ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}(\text{OH})_2$) y carbonato de calcio; mientras que la parte orgánica está formada por macromoléculas de proteína compuesta por cadenas enroscadas formando triples hélices. Estas cadenas están alineadas y unidas para formar una especie de fibrillas que a su vez adquieren un arreglo que asemeja a unos canales. En ellos, los cristales minerales en forma de placa (apatita) son depositados. Una representación gráfica se muestra en la figura 2-1.

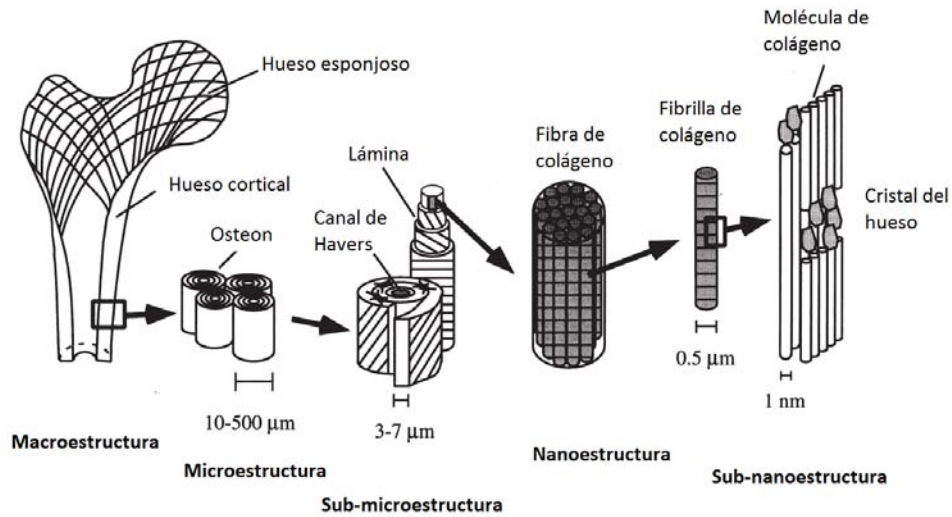


Figura 2-1: Esquema de la estructura del hueso. Imagen extraída de [16]

A grandes rasgos la estructura del hueso consiste en agua (10 wt %) y fibras de colágeno (20 - 30 wt %)¹ constituyendo un armazón dentro del cual los cristales de apatita carbonatada (60 - 70 wt %) se forman a lo largo de su crecimiento (figura 4-5). Posterior a la muerte del vertebrado, las proporciones de los componentes óseos cambian y varían dependiendo de la cantidad de tiempo que estén enterrados o los efectos de la contaminación.

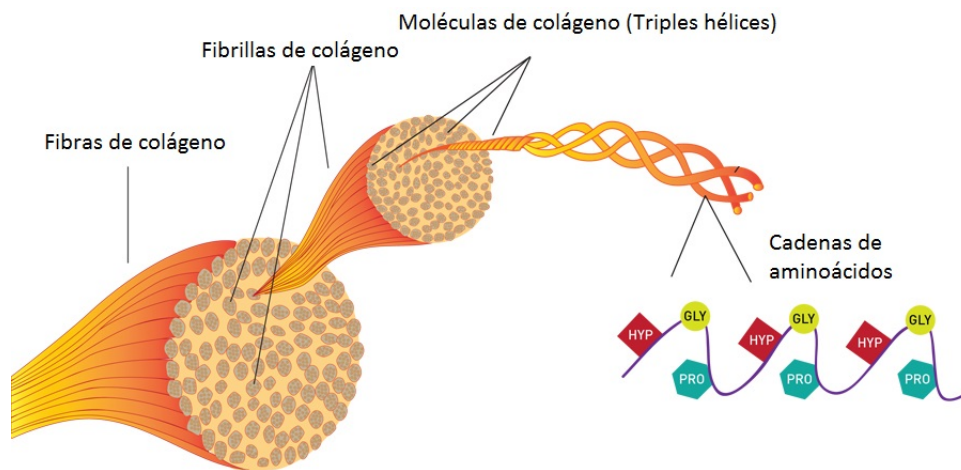


Figura 2-2: Esquema de la estructura del colágeno

¹ wt % se refiere al porcentaje del peso total

En los primeros años del uso de la técnica de datación por ^{14}C , el hueso parecía ser un material difícil de tratar debido a que su estructura porosa y gran contenido de carbono inorgánico llevaban a pensar que la contaminación e intercambio isotópico con elementos del suelo podría ser muy común. Sin embargo, para los arqueólogos este material es de suma importancia ya que conocer la edad de un hueso proporciona mucha información precisa sobre el contexto y época al que pertenece. Esto provocó que se siguiera haciendo un estudio para encontrar la fracción del hueso con suficiente integridad isotópica del que se pudiera obtener información confiable.

Tabla 2-1: Principales fracciones de hueso usado para análisis por ^{14}C

Fracciones inorgánicas
Carbonatos externos en la estructura de apatita
Carbonatos diagenéticos/secundarios
Fracciones orgánicas
Fracciones de ácido soluble, ácido insoluble, base soluble y base insoluble.
Colágeno
Gelatina
Aminoácidos totales
Aminoácidos específicos

Parte de los objetivos de dichos estudios ha consistido en aislar las dos fracciones y hacer pruebas para conocer sus propiedades. Los componentes de la parte inorgánica del hueso están unidos mediante enlaces iónicos, esto quiere decir que sus componentes son lábiles, provocando la sustitución de los componentes originales por otros elementos o la creación de espacios vacíos [17], lo que provoca que existan variaciones en su composición (figura 2-3) y hace indistinguibles los contaminantes de la estructura original y por lo tanto fechamientos erróneos cuando se ha usado esta fracción.

Por otro lado, los componentes inorgánicos del tejido oseo están unidos por enlaces covalentes, por lo que su estructura es insoluble en agua. Hasta ahora no se tiene conocimiento de mecanismos por los cuales las proteínas involucradas puedan intercambiar carbono después de muerto el individuo, además de que esta fracción es sensible a los ácidos usados para las limpiezas (generalmente HCl), lo que hace más sencilla la eliminación de contaminantes ex-

ternos; esto llevó a los expertos a concluir que la fracción orgánica de los huesos es la que conserva la información más confiable para realizar el procedimiento de fechar, sin embargo, la investigación no terminó ahí. Como se puede ver en la tabla 2-1, existe una clasificación del material orgánico presente en el hueso, por ello las pruebas se han extendido a conocer cuál de estos componentes es el mejor candidato. Se han establecido diversos mecanismos de extracción que van desde limpiezas superficiales hasta lavados químicos para eliminar los contaminantes a nivel molecular, para obtener la fracción menos degradada. Estos mecanismos son secuenciales y aunque varían de laboratorio en laboratorio, en general todo comienza con la descalcificación del hueso mediante un baño en ácido clorhídrico para eliminar la parte inorgánica, posteriormente baños en un alcalí (generalmente NaOH) que elimina ácidos húmicos², seguido por calentamientos a temperaturas mayores a 70°C para obtener la "gelatina" cuyo principal componente es el colágeno. Finalmente se hacen filtrados para obtener la fracción menos fragmentada de colágeno y ésta se seca usando estufas a temperaturas moderadas durante aproximadamente 12 horas. Hasta ahora estos procedimientos han demostrado ser efectivos, sin embargo, es muy común que el grado de contaminación llegue hasta nivel molecular de la muestra. Tal es el caso de la diagénesis, explicada posteriormente. En otros laboratorios se ha hecho la separación de aminoácidos específicos (por ejemplo la hydroxyprolina presente en el colágeno que contiene aproximadamente 10 % del carbono perteneciente al colágeno [18]), sin embargo, esos procedimientos todavía no son adoptados en la mayoría de los laboratorios.

² Consisten en mezclas heterogéneas de moléculas de pequeño tamaño que se forman a partir de la transformación biológica de células muertas y se asocian mutuamente en estructuras supramoleculares, que pueden separarse en sus componentes de menor tamaño por fraccionamiento químico

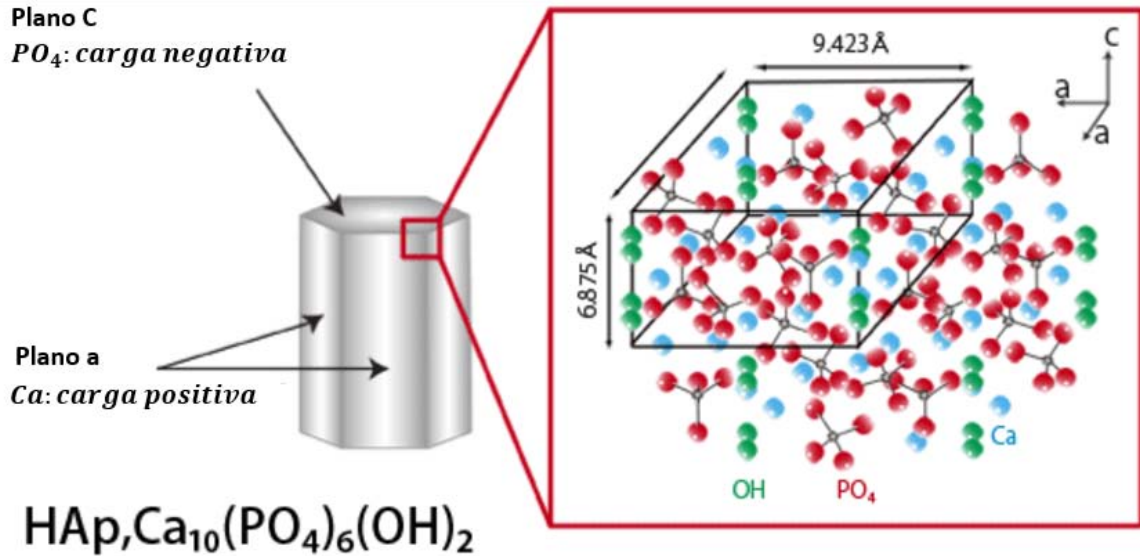


Figura 2-3: Esquema de la hidroxiapatita en el hueso. Está constituida por 10 átomos de calcio, 6 de fosfatos y 2 hidroxilos, cuando le falta un calcio o un fosfato en su arreglo tridimensional, ésta llena ese espacio vacío con otra especie. Imagen extraída de http://sofsera.co.jp/english/tech1_e.html.

2.1. Diagénesis en huesos

Los huesos pueden pasar largos periodos de tiempo enterrados en ambientes arqueológicos diversos. Debido a ello, pueden sufrir cambios en su estructura y su composición química o diagénesis.

Durante el tiempo de vida ocurre un proceso de remineralización en los huesos, esto se ve reflejado en su histología, composición isotópica y composición elemental, sin embargo, fenómenos como la absorción de cationes y de compuestos inorgánicos que circulan a su alrededor, intercambio de iones, lixiviación³ y separación del colágeno, ataque de microbios o alteración de la matriz mineral hacen que los huesos pierdan parte de su material original y este sea reemplazado por alguna otra sustancia. En particular, la diagénesis en huesos se refiere a la

³ La lixiviación consiste en la eliminación o extracción de un componente soluble (soluto) contenido en un sólido mediante un solvente apropiado.

sustitución del colágeno por sustancias inorgánicas. La estructura cristalina de la hidroxiapatita la hace susceptible a los procesos de diagénesis y por lo tanto volverse inestable [19].

Existen varios aspectos importantes que se toman en cuenta al estudiar este tipo de modificación interna. Primero se debe entender la naturaleza de la diagénesis durante el enterramiento, esto está relacionado con la diferencia de condiciones sujetas a la diversidad de ambientes. Además, al ser los huesos materiales de los que se obtiene información a diferentes niveles (isotópico, molecular, bioquímico y estructural), se debe tomar en cuenta la manera específica en la que esta información se altera en cada uno de ellos.

Medición de diagénesis

Los estudios de diagénesis se han concentrado en relacionar cuatro parámetros principales, que a su vez están divididos en dos grupos. El primero se relaciona con los efectos de la diagénesis sobre el hueso, e incluye al *contenido de colágeno* y la *integridad histológica*; el segundo contiene a los parámetros relacionados con la respuesta del hueso a su medio ambiente: *porosidad* y *cristalinidad* [20].

■ **Contenido de colágeno**

Al medir la cantidad de colágeno presente en un hueso después de ser extraído de su depósito, puede hacerse una estimación de la cantidad del material orgánico perdido a causa de algunos procesos que serán explicados posteriormente. Este factor está directamente relacionado con la cantidad de contaminantes que pudieron afectar la composición del hueso y con el proceso de extracción de esta fracción en cada laboratorio.

■ **Integridad histológica**

Se refiere al análisis del tejido perteneciente al hueso. Es posible obtener información de los efectos de ataques microbianos y diagénesis en general, haciendo evaluaciones histológicas del hueso.

- **Porosidad**

Este parámetro (relacionado con la densidad) se refiere al diámetro de los poros en la estructura del hueso y su distribución espacial. Poros grandes permiten la incorporación de agua y por consiguiente degradación en el colágeno.

- **Cristalinidad**

También llamado "splitting factor"(abreviado SF y denominado factor de divisibilidad), la cristalinidad es un indicador del tamaño relativo de los cristales y la manera en la que los átomos están acomodados en la red. Las alteraciones post-mortem en la estructura de los huesos están relacionadas con la fase orgánica del hueso, por eso la pérdida de material orgánico se relaciona con este factor.

Se ha concluido que estos parámetros se relacionan según el sitio en donde se encuentren las muestras y que además la relación entre los factores antes mencionados crece con la cantidad de diagénesis.

Procesos de cambio

Tomando en cuenta los factores medidos para observar diagénesis, existen diversos procesos que modifican las características del hueso involucradas en la extracción de colágeno.

- **Disminución de colágeno y ataque microbiano.** No se conocen a detalle todas las características de este aspecto debido a la variedad de especies microbianas y huesos, sin embargo se sabe que no hay efectos definitivos sobre las muestras. Puede ocurrir que la fase orgánica del hueso y los cristales de apatita causen bajo ciertas condiciones, protección hacia el hueso contra la contaminación interna; o que la pérdida de colágeno debida a ataque microbiano e hidrólisis tengan un efecto distinguible en el proceso de recristalización y por lo tanto en el intercambio ionico de hidroxiapatita en las siguientes etapas de la diagénesis. La incorporación de moléculas de agua a la estructura es posible ya que el colágeno (hidrofílico) se puede volver soluble mediante la ruptura de los

enlaces cruzados entre las hélices y fragmentación. Esto lleva a que el agua incorporada provoque fisuras que permiten el acceso a iones ajenos al hueso. El ataque microbiano es reflejado en la porosidad de los huesos que son atacados, debido a que ésta aumenta considerablemente [1].

■ **Recristalización y biomineralización.**

Como consecuencia de la disminución de colágeno, los espacios "vacíos" permiten la entrada a fluidos sedimentarios y minerales diagenéticos, lo cual implica algunas diferencias entre tamaños de los cristales. Puede ocurrir que los más largos crezcan a expensas de otros de menor tamaño. Por otro lado, la recristalinización da lugar a procesos de intercambio iónico en los que los cristales se vuelven más largos y más ordenados, lo cual hace que el SF crezca.

Parámetros ambientales

Además de los aspectos tomados en cuenta para medir la diagénesis, es importante conocer los parámetros dependientes de la diversidad de ambientes y que igualmente afectan la manera en la que las muestras son perjudicadas. Aunque se pueden hacer diferentes clasificaciones de estos parámetros, en este trabajo se enlistan tres principales:

■ **Temperatura**

Todos los agentes anteriormente mencionados, tienen variaciones según la temperatura. Esto indica que la preservación del colágeno depende de los diversos entornos en donde la temperatura es un factor característico.

■ **Hidrología**

Se conocen tres tipos principales de ambientes hidrológicos; muy secos, intermedios y muy húmedos. En el primero de ellos la acción de microbios sobre las muestras es poca, en los intermedios a pesar de que existen variaciones, éstas no tienen gran influencia en la magnitud de los ataques microbianos. En los ambientes donde la humedad es elevada,

la cantidad de oxígeno es escasa, por lo que al igual que en los ambientes muy secos, los microbios no afectan en gran medida la estructura del hueso.

■ **Geoquímica**

Éste es un criterio que incluye los efectos sobre las muestras dados por concentraciones de solutos, cambios de pH y potencial de reducción. Es muy difícil conocer los cambios debidos a cada uno de los posibles valores para estos aspectos, sin embargo, se sabe que influyen en la diagénesis en los huesos.

Consideraciones adicionales

Todas las muestras de hueso presentan características únicas. Es importante considerar que las fuentes de contaminación en cada caso son diferentes y por tanto es necesaria una comprensión lo más completa posible del entorno en el que ha estado depositado el material, las modificaciones que ha sufrido el ambiente y por lo tanto la muestra. Tampoco se debe “asumir” que los huesos tienen un buen o mal estado de preservación basándose en factores como el tiempo que han estado enterrados o depositados en un ambiente dado. Puede ocurrir que algunos huesos antiguos hayan pasado mucho tiempo depositados en lugares con condiciones climáticas y ambientales estables, por lo que su degradación es mínima en comparación con otros más recientes que han estado bajo condiciones muy extremosas (tales como cenotes) y por lo tanto presentan un mayor estado de degradación.

Otro ejemplo en el que se resalta la importancia de relacionar información adicional sobre la muestra con las fechas que se obtienen de su análisis, es el de la datación de herramientas hechas con huesos y que pasan por procesos de limpieza o incineración previos al depósito. Es de suma importancia que se haga la distinción entre las fechas arrojadas por estos objetos y las de otros huesos hallados en el mismo lugar pero que siguieron los procesos normales de cadaverización.

Por casos como éstos, es esencial que los usuarios del LEMA, proporcionen información sobre las condiciones a las que estuvo sujeta la muestra y así se pueda lograr la correcta interpretación de los datos.

Capítulo 3

Objetivos

En este trabajo se pretende hacer una caracterización de las muestras de hueso analizadas hasta ahora en LEMA, mediante su análisis elemental antes y después de su tratamiento para hacer una comparación entre sus propiedades. Se busca además alguna relación entre parámetros característicos de cada una de las muestras (%N, %C y C/N) y su estado de preservación (rendimiento de colágeno), tomando como base los trabajos realizados por *Brock et al*^[2] y *Klinken et al*^[21].

Además, se quiere conocer las condiciones bajo las cuales se alcanza la reproducibilidad entre fechas correspondientes a fracciones obtenidas de algunas muestras de hueso elegidas durante tres fases diferentes en el proceso de extracción de colágeno: **colágeno total**, **colágeno Ultrafiltrado (UF)** y **colágeno insoluble**.

Finalmente se quiere obtener indicios sobre los parámetros característicos de muestras de hueso mexicanas (obtenidas de diferentes regiones geográficas) para su datación con la técnica de EMA.

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1. Descripción de las muestras

Todas las muestras de hueso analizadas en el LEMA provienen de estados de la República Mexicana. Las condiciones de clima y los tipos de enterramiento así como el contexto temporal al que pertenecen son distintos. Los huesos fueron proporcionados por el Maestro Guillermo Córdova Tello, el Dr. Alejandro Terrazas Mata, la Arqlga. Carmen Rojas Sandoval , la Dra. Lorena Valencia Caballero y el Maestro José Concepción Jiménez López.

Tabla 4-1: Clasificación sobre los estados de donde provienen las 54 muestras analizadas y los tipos de clima de la zona

Procedencia	Contexto climático	N° total de muestras	N° muestras con rendimiento $\geq 1\%$
Coahuila	Árido	2	2
Durango		1	1
Hidalgo		6	6
Zacatecas		10	5
Ciudad de México		5	1
Puebla		2	1
Michoacán		3	2
Sonora		2	0
San Luis Potosí	Húmedo	11	3
Chiapas	Tropical	3	1
Quintana Roo	Cenotes	9	0

El datación de huesos por la técnica de ^{14}C es de gran interés para la comunidad de arqueólogos, una de las principales razones es que su estructura química (basada en proteínas) es bien conocida. Los huesos han ayudado a establecer y conocer más sobre el pasado de los seres humanos en contextos especiales, esto basándose en la hipótesis de que las muestras estudiadas son generalmente suficientemente grandes para eliminar la posibilidad de haber sido trasladadas grandes distancias. Es cierto que no existe una manera de comprobar que las edades calculadas son correctas, a excepción de aquellas que ya son conocidas por otro método, por lo que generalmente se hacen evaluaciones de la precisión en las medidas basándose en información relacionada con algunos factores arqueológicos propios de alguna época o lugar en especial.

A través del tiempo, los resultados provistos por la técnica han sido cuestionados. Por esta razón los diversos laboratorios dedicados a datación con ^{14}C , se han dado a la tarea de experimentar y tratar de optimizar la técnica para llevar a los mejores resultados, esto enfocándose en su reproducibilidad en dos formas: la primera, haciendo variaciones en la preparación de la misma muestra en un laboratorio para comparar los resultados y la segunda, comparando resultados de una misma muestra entre diferentes laboratorios.

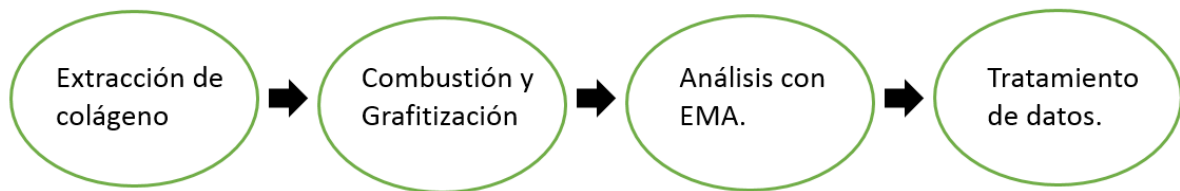


Figura 4-1: Esquema general del tratamiento para una muestra en LEMA.

La técnica requiere de diversas etapas que van desde la limpieza de la muestra, producción de CO_2 , purificación de CO_2 y reducción a grafito. Debido a todos los factores contaminantes mencionados anteriormente, la preparación de los huesos y medición de datos en LEMA es formada por varias etapas en las que se va eliminando gradualmente todo tipo de contaminante posible hasta llegar a la medición y calibración final de datos. En LEMA se sigue un procedimiento general establecido para todas las muestras (esquema en la figura 4-1) desde que

comienza el procedimiento para fecharlas, sin embargo en algunos casos se hacen variaciones debido a condiciones o características especiales de algunas muestras. Estos detalles serán discutidos posteriormente.

4.2. Extracción de colágeno en el LEMA

Hasta el momento, no se ha establecido un proceso de pre-tratamiento de huesos general, sin embargo la mayoría sigue un método basado en el método de Longin publicado en 1971.

La extracción del colágeno en huesos es uno de los más grandes desafíos. Es muy común que el material sea insuficiente, que esté contaminado con carbono externo o incluso que no se pueda saber si el carbono extraído es propio de la muestra o no. Asimismo, el estado de preservación de las muestras es un factor resolutorio al momento de hacer los cálculos. La técnica de EMA ha sido de gran ayuda eliminando o disminuyendo algunas de las dificultades relacionadas con el tamaño de la muestra o la limpieza del hueso hasta cierto nivel, sin embargo, no se ha podido encontrar alguna solución concreta cuando la diagénesis es muy avanzada. En LEMA y en algunos otros laboratorios, existen casos en los que se hace un pre-tratamiento individual y específico para cada una de las muestras, lo cual repercute en el tiempo que tardan en estar listos los resultados.

Ésta etapa del tratamiento de la muestra consiste en algunos pasos para eliminar contaminantes tanto externos como internos en los que se utilizan procedimientos físicos y químicos. En el diagrama 4-3, están listados los pasos seguidos para lograr este objetivo. Y estos se describen más detalladamente como sigue:

- **Limpieza externa.** En esta etapa son eliminadas algunas sustancias incorporadas a la superficie del hueso, cuyo origen puede ser el entorno en donde fueron encontradas o alguna sustancia adherida para su conservación. La primera parte de la limpieza superficial se hace tallando cuidadosamente el hueso con una espátula limpia. Posteriormente, la muestra se introduce en tubo Falcon y se somete a baños ultrasónicos de 15 minutos hasta que el agua decantada después de hacerlo ya no se vea turbia. Para secar el hueso,

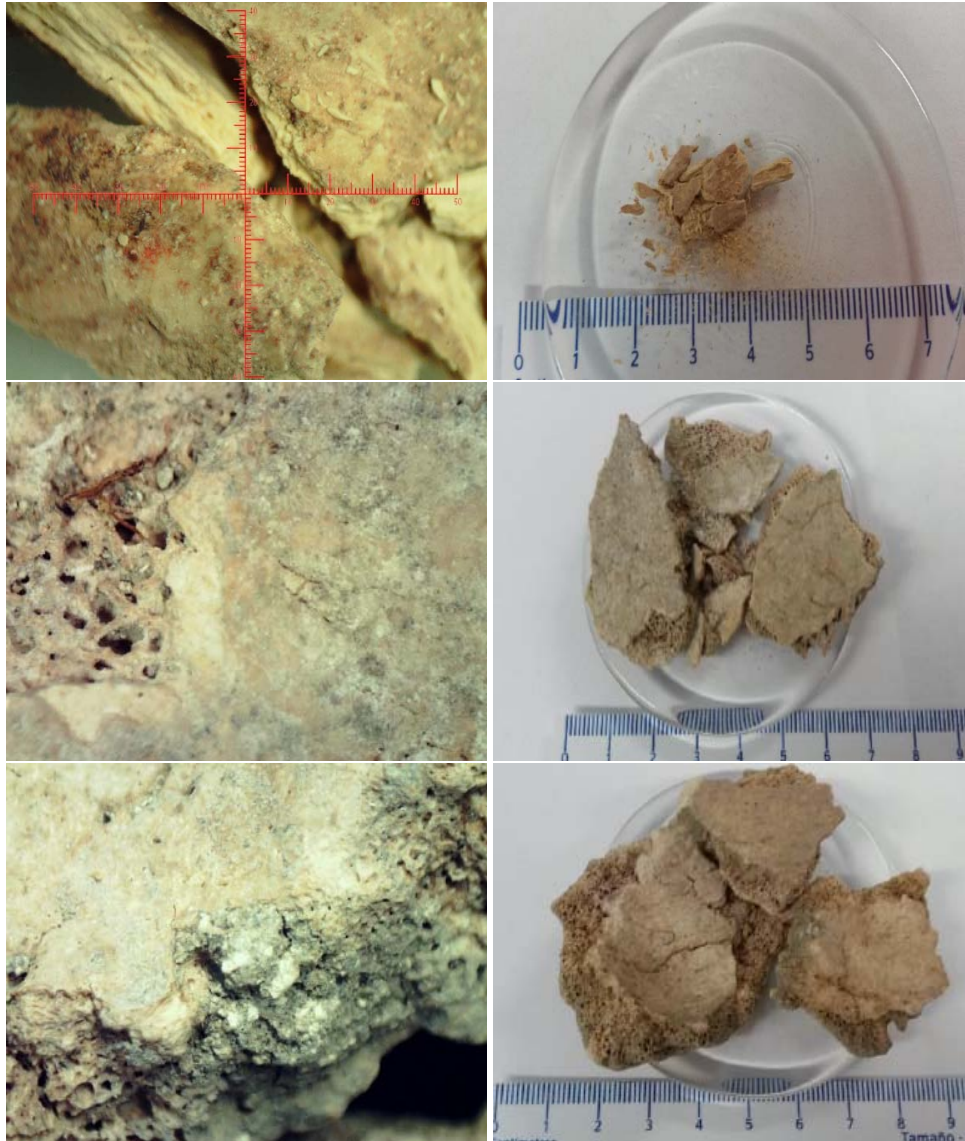


Figura 4-2: Fotografías que ejemplifican el estado inicial de tres muestras de hueso recién llegadas al LEMA.

se retira la tapa del tubo Falcon sustituyendola por una de aluminio, a la que se le hacen pequeños agujeros usando una aguja estéril con el propósito de que el agua se evapore. Para concluir con este paso, el tubo Falcon se mete a la estufa a una temperatura de 60 °C.

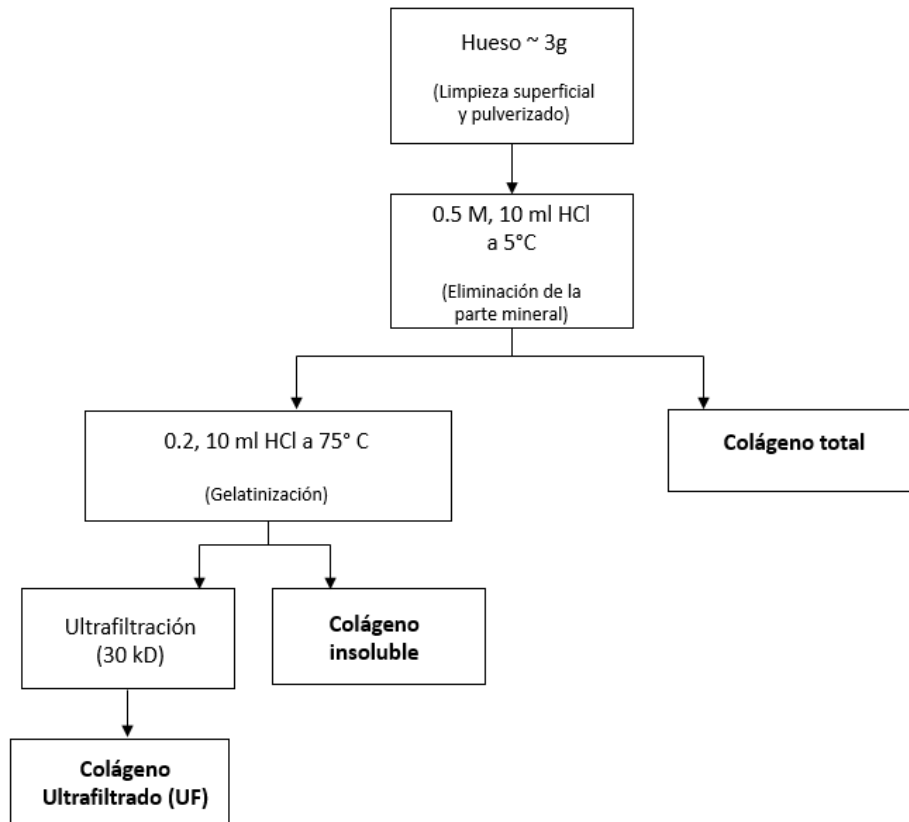


Figura 4-3: Esquema resumido sobre la preparación de los huesos

- **Molienda de hueso.** Es importante obtener un tamaño de la muestra de tal forma que su manipulación sea fácil. En esta etapa del pre-tratamiento se pesan de 3.0 a 3.5 gramos de hueso ya seco, posteriormente se coloca dentro de un mortero de acero inoxidable limpio y se pulveriza la muestra golpeando el pistilo del mortero con un mazo de goma repetidas veces. Se separan de 2 a 3 miligramos de hueso pulverizado y se colocan en un tubo Eppendorf para un posterior análisis elemental.
- **Preparación de soluciones molares.** Para hacer los baños ácidos, se preparan dos soluciones de HCl:
 - a) HCl 0.5 molar: Usando 42 ml de HCl a 37 % aforado a un litro con agua desionizada.
 - b) HCl 0.5 molar: Usando 17 ml de HCl a 37 % aforado a un litro con agua desionizada.

- **Descalsificación.** Esta etapa tiene como objetivo principal disolver los el carbono inorgánico de la muestra; para ello primero se colocan 3 gramos de hueso pulverizado en un tubo Falcon (cuidadosamente etiquetado), se le agregan 10 ml de HCl 0.5 M y se agita usando un mezclador de vórtice. Se guarda la mezcla en el refrigerador por un periodo de 24 horas a 5 °C. Posteriormente, se agrega agua desionizada y se vuelve a agitar con un mezclador de vórtice para después centrifugar la mezcla a 4400 rpm por 3 minutos y al terminar se decanta el sobrenadante. Se hace una valoración de qué tan limpia está la muestra, observando si ésta burbujea después de agregarle 10 ml de HCl 0.5 M, si sí lo hace, se mete nuevamente al refrigerador por 8 horas y se centrifuga una vez más. Se repite la valoración de limpieza y se repiten los pasos hasta que deje de burbujear cuando se le agrega HCl 0.5 M. Cuando ya no hay burbujeo, se hacen enjuagues llenando el tubo Falcon con agua desionizada, agitando, centrifugando y decantando hasta que se logra un pH de 5 - 6. Se hace una separación de 40 a 50 mg de muestra en un tubo Eppendorf, a esta fracción en LEMA se le llama *colágeno total* el cual se seca en la estufa para un posterior análisis.

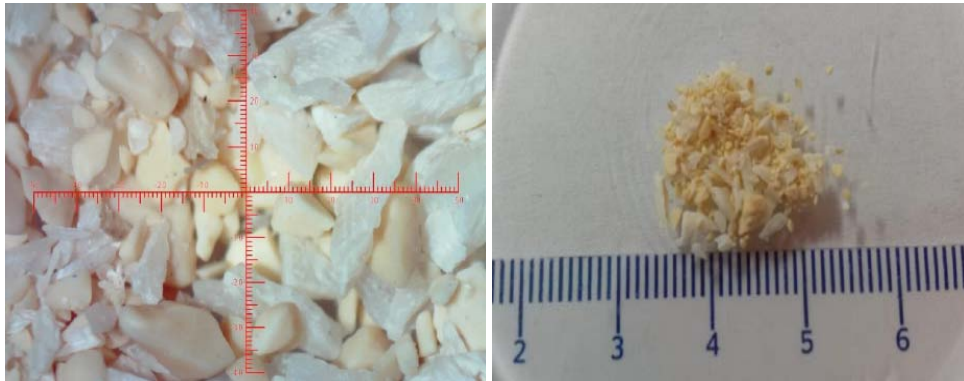


Figura 4-4: Fotografías del resultado de las primeras etapas de la limpieza de una muestra de hueso.

- **Gelatinización.** Se agregan 10 ml de HCl 0.2 M a la muestra restante en el tubo Falcon y se deja en baño seco a 75 °C por un periodo de 10 a 12 horas.
- **Limpieza de los filtros y prefiltros.** Los filtros utilizados son del tipo Amicon de 30

kD, un pre filtro Millex de 20 μm y una jeringa por cada muestra de hueso que se quiere preparar.

- a) Filtros. Se saca el filtro Amicon de 30 kD de su tubo de 50 ml y se somete a un baño ultrasónico de 15 minutos. Se regresa el filtro a su tubo, se llena con agua ultra pura y se tapa. Bien tapado se coloca en la centrifugadora por 30 min a 4400 rpm y al final se decanta el agua. Estas indicaciones se repiten tres veces. Finalmente se coloca el filtro en un vaso de precipitados lleno de agua desionizada y con una tapa de aluminio. Es importante mencionar que este lavado debe hacerse máximo 24 horas previas al momento de su uso.
 - b) Prefiltros. Se someten a un baño ultrasónico con agua desionizada por 15 minutos (3 veces). Posteriormente, se colocan en un vaso de precipitados con tapa de aluminio e hidratándose con agua desionizada durante no más de 24 horas previas al momento de su uso.
- **Ultrafiltración.** Se deja enfriar a las muestras por 15 minutos después de haberlas sacado del baño seco. La fracción sobrenadante es parte esencial del colágeno, por lo que esta parte es cuidadosamente transferida al filtro de 30 kD del tubo Amicon usando una jeringa y haciéndola pasar por el prefiltro primero. Luego, se centrifuga a 4400 rpm por 3 minutos y si es necesario, se repite esta parte hasta que queden de 1 a 0.5 ml de colágeno >30 kD en el filtro, de esta forma se obtiene el *colágeno ultrafiltrado*. Las partículas menores a esta medida, son desechadas.
 - **Liofilización.** Primero se debe pesar un tubo Roth vacío y con tapa (anotando cuidadosamente la masa en la bitácora). Posteriormente, usando una pipeta Pasteur, se pasa la fracción de colágeno al tubo Roth que luego se tapa y se congela con nitrógeno líquido. Una vez congelado, se liofiliza la fracción durante 24 horas y se pesa nuevamente el tubo Roth (anotando el dato de la masa en la bitácora). Para evitar la intrusión de polvo o algún otro contaminante proveniente del laboratorio, es altamente recomendable rodear la tapa del tubo Roth con plástico sellador y guardarlo en la cámara de vacío.



Figura 4-5: Fotografías del colágeno UF extraído de una de las muestras en el LEMA.

4.3. Combustión y grafitización

El proceso de medición en Espectrometría de Masas con Aceleradores, requiere la separación del carbono presente en muestra inicial de hueso y su reducción a una muestra de grafito. Para ello, en LEMA se cuenta con un Analizador Elemental (AE) y un equipo de grafitización automatizado (AGE III) mostrados en la figura 4-6.

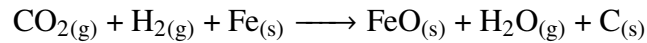


Figura 4-6: Analizador Elemental (parte izquierda) y Grafitizador (parte derecha).

Una vez que el colágeno ha sido extraído de las muestras, éstas son pesadas y cada una es colocada en un crisol de estaño para posteriormente introducirlas al AE a una temperatura de 950°C, provocando así su combustión. El resultante es conducido por un gas de He hasta ser inyectado en el tubo de reducción junto con los componentes de la muestra quemada (N_2 , CO_2 ,

H₂O, y SO₂). Como siguiente paso, los gases son separados por una columna TPD (*Temperature Programed Dissorption*). En esta columna el N₂ fluye libremente, por lo que primero ocurre la detección de este componente. Para la detección de los componentes restantes ocurre un calentamiento gradual de la columna TPD como sigue : a 60°C se libera el CO₂, a 100°C se libera H₂O y a 200°C se libera el SO₂.

Ya separado el CO₂ es inyectado en el AGE III en donde es atrapado por una trampa de zeolita. Antes de ser usado, los reactores del AGE III son acondicionados con una masa de Fe reducido, de esta forma cuando el CO₂ es liberado de la trampa y el catalizador H₂ es inyectado, se completa la reacción de grafitización:



Esto da como resultado una pastilla de FeO y C en forma de grafito, mientras que el agua es atrapada en la parte superior de los reactores por enfriadores que funcionan mediante efecto Peltier. Finalmente el grafito es prensado usando un cátodo de aluminio y una prensa de 5 Ton para después ser introducidas al carrusel porta muestras del acelerador. En la figura 4-7 se muestra una síntesis del proceso de combustión y grafitización que ocurre en LEMA.

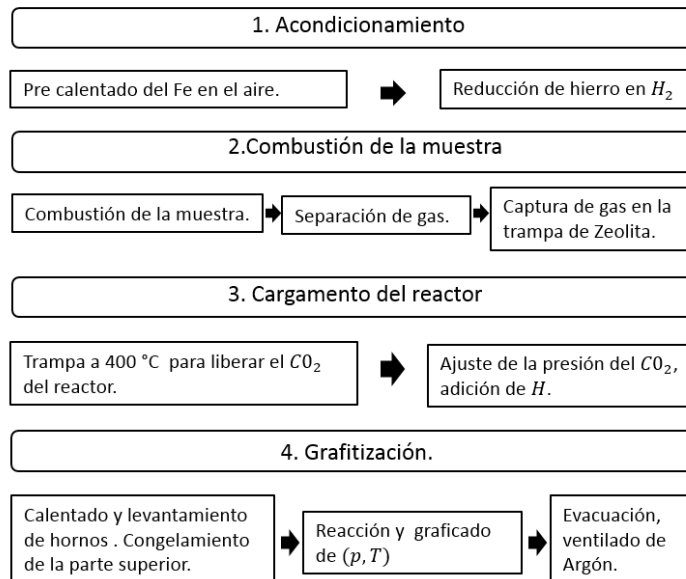


Figura 4-7: Esquema del proceso de grafitización.

Una ventaja importante del uso de este equipo automatizado de grafitización, es que se evitan efectos de memoria ya que cada vez que termina una inyección de CO₂, se le aplica calor y Ar a la trampa de zeolita para limpiarla. De esta manera, es eliminada la posibilidad de que las muestras se contaminen unas con otras.

4.4. Análisis con EMA

El primer método de datación con radiocarbono tenía como objetivo el conteo del número de decaimientos de ¹⁴C durante un intervalo conocido de tiempo, usando una masa de muestra cuyo tamaño era del orden de gramos. Esta técnica resultó eficiente y aunque actualmente se sigue usando, se ha desarrollado una nueva técnica en la que mediante un acelerador y un espectrómetro de masas, se puede medir la cantidad de ¹⁴C en una muestra y con ello estimar su edad aproximada.

El objetivo de la técnica de *Espectrometría de Masas con Aceleradores* (EMA) es la selección de partículas específicas usando campos eléctricos y magnéticos. Esto es logrado de la misma manera que en los espectrómetros de masas convencionales, en los que para diferenciar a los componentes de interés en las muestras, estos se separan recorriendo distintas trayectorias relacionadas con propiedades como su energía E , masa M y carga q .

Recordando que cuando una partícula atraviesa por un campo magnético B perpendicular a su trayectoria, esta describe un radio de curvatura dado por:

$$\rho = \sqrt{\frac{2ME}{qB}}$$

Es posible describir a los tipos de filtros electromagnéticos utilizados en los espectrómetros de masas [22] :

- **Deflector magnético.** Aplicando un campo magnético y mediante la rigidez magnética asociada ($B\rho$), se desvían a las partículas de interés en las trayectorias deseadas.

$$B\rho = \frac{\sqrt{2ME}}{q}$$

- **Deflector electrostático.** Usando un campo eléctrico (ϵ) y la rigidez eléctrica asociada ($\epsilon\rho$), son seleccionadas aquellas partículas que cumplan la condición.

$$\epsilon\rho = \frac{2E}{q}$$

- **Resonancia de ciclotrón.** Mediante la relación de frecuencia de ciclotron ω , también son controladas algunas trayectorias específicas.

$$\frac{\omega}{B} = \frac{q}{M}$$

- **Filtro de Wien (Selector de velocidades).** Usando la velocidad, es posible elegir partículas con cierta masa y energía específicas.

$$v^2 \propto \frac{E/q}{M/q}$$

Usando un acoplamiento adecuado de estos filtros es posible ilustrar un espacio fase (Figura 4-8) generado por el acoplamiento de los filtros. Además, un acelerador de partículas tipo Tandem de 1 MV, provee algunas ventajas para el objetivo de la selección y medición de ^{14}C , además de ^{13}C y ^{12}C , isótopos estables cuya medición es indispensable para un análisis completo de la muestra.

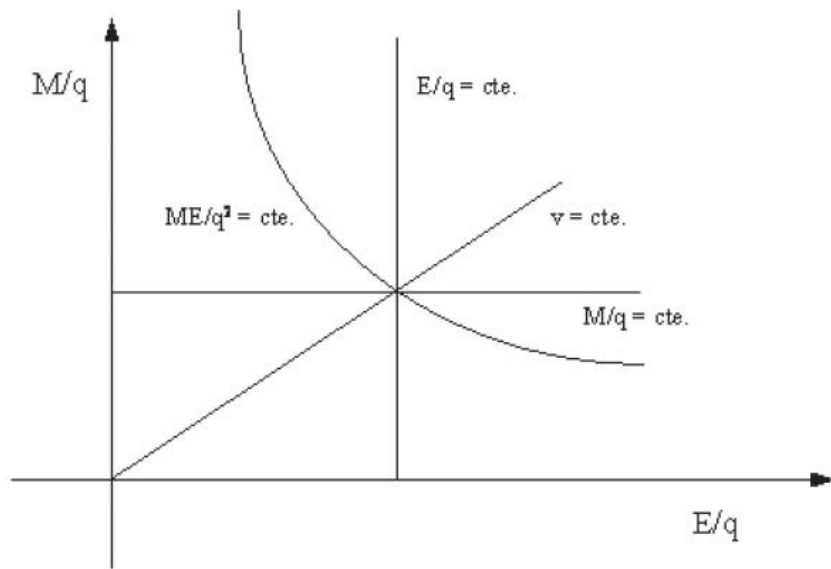


Figura 4-8: Espacio fase en el que son elegidas las partículas buscadas [23].

La inclusión de aceleradores al sistema de espectrometría de masas (altas energías) también ha permitido aprovechar las técnicas de detección nuclear para ampliar y controlar la información que se obtiene al hacer mediciones de ^{14}C . Además es posible la eliminación de diversos tipos de "intrusos" al isótopo que se quiere medir como : isobaros del ^{14}C , iones cuya masa y energía son múltiplos de las que se buscan o moléculas con masa suficientemente parecida a la del isótopo buscado.

4.5. Separador isotópico del LEMA

Como primer elemento, el sistema cuenta con un carrusel con cincuenta posiciones para colocar los cátodos que contienen las muestras después de haber sido prensadas. Posteriormente, el sistema puede ser dividido en tres partes principales para un estudio más detallado y ordenado [23]:

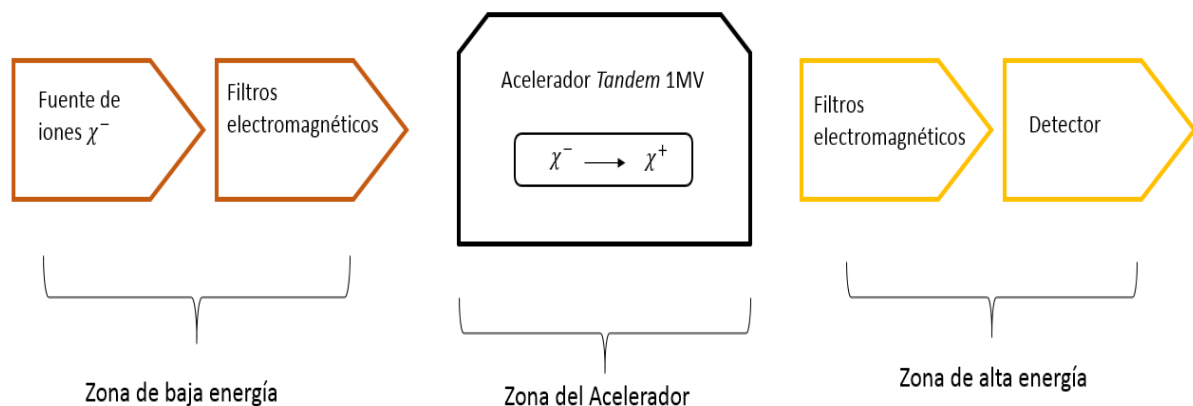


Figura 4-9: Esquema básico del acelerador.

En la primera parte del sistema, llamada *zona de baja energía*, se encuentra la fuente de iones, formada por un reservorio de Cesio que es calentado hasta evaporarse para adherirse a la superficie de una placa metálica esférica (ionizador), esto provoca que el Cs pierda un electrón y los iones negativos resultantes choquen con el cátodo que contiene la muestra, erosionándola y produciendo a su vez iones negativos provenientes de la muestra. Al proceso de erosión catódica debida a los átomos de Cs se le conoce como sputtering y es de las técnicas más utilizadas en las fuentes de iones, sin embargo, suele tener dispersiones de energía del orden de 0.1 % y por ello provocar la formación de ciertas colas de alta energía en de tipo $1/E^2$. Esto se soluciona con la inclusión de algunos componentes posteriores.

La cantidad de muestra usada en AMS es generalmente del orden de 1 mg o menos, por esta razón la eficiencia de ionización en la fuente debe ser alta para lograr que la corriente extraída sea suficientemente alta para poder medirla, esto se logra controlando el flujo de gas Cs que se introduce a la cámara. Además, los efectos de memoria deben ser eliminados ya que el constante cambio de muestras provocaría señales falsas provocadas por las analizadas anteriormente. La fuente de iones puede ser considerada como un primer filtro para aquellos elementos que son inestables de forma aniónica.

Posterior a la fuente, se sitúa el electrodo de extracción, cuya función es acelerar y focalizar esos iones para formar un haz de salida. En seguida, el haz atraviesa la primera lente electros-

tática, ubicada después de la fuente de iones. Esta lente es del tipo Einzel y se caracteriza por estar compuesta de tres cilindros de los cuales, el central recibe un potencial, esto provoca que no haya cambio de energía en los iones y además exista un efecto de enfoque del haz.

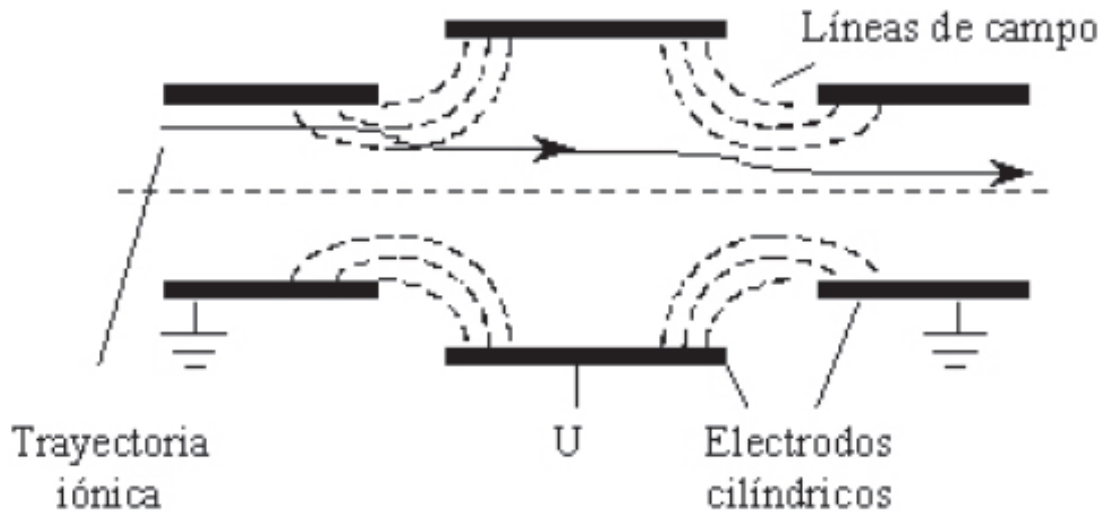


Figura 4-10: Esquema de una lente tipo Einzel.

Posteriormente, un deflector electrostático esférico (ESA) realiza la primera selección de iones según su carga y energía momento (EM/q^2). Éste consta de dos placas paralelas, cada una de ellas está conectada a una fuente de potencial con lo que se logra un enfoque tanto vertical como horizontal. El haz, es entonces dirigido hacia otra sección en la que se hace otra focalización antes de ser inyectado al deflector magnético. En esta parte, al mismo tiempo actúan sobre él otra Lente Einzel, dos electrodos planos que forman un tubo de dirección (Y-Steerer) y algunas aperturas que controlan el tamaño del haz.

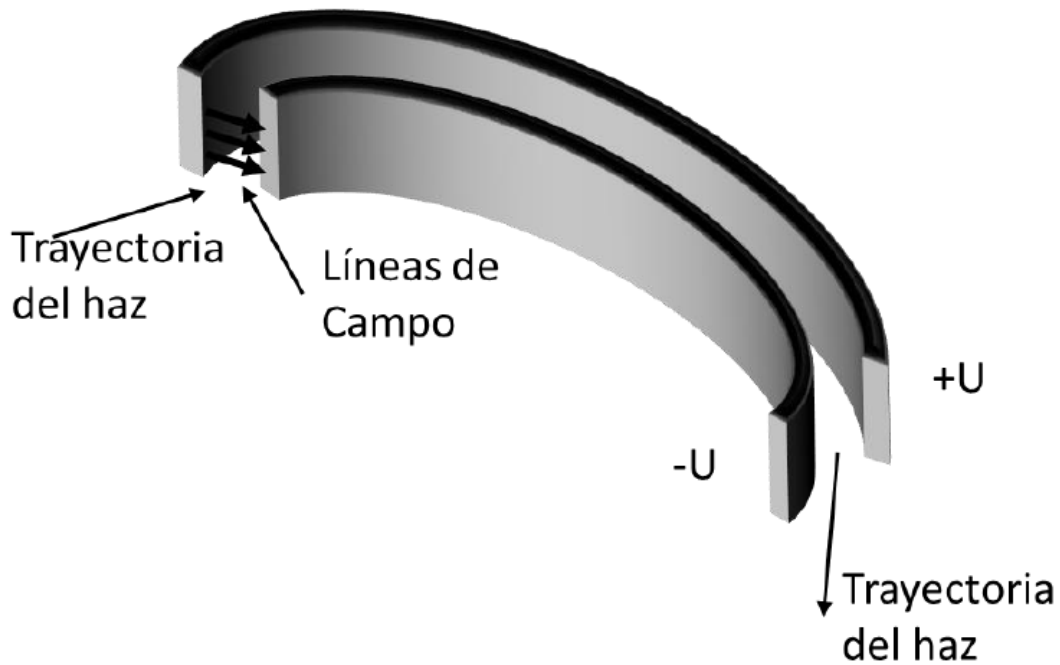


Figura 4-11: Esquema de la primera lente electrostática en el sistema.

El siguiente paso es en el deflector magnético que actúa como un selector de masas escogiendo aquella que corresponde a la del isótopo que se quiere seleccionar. Esto es posible debido a que el campo eléctrico que les es aplicado a todos los iones en el ESA es el mismo, por lo que elegir una energía determinada, es equivalente a elegir una masa. En el deflector magnético, el haz de partículas cargadas experimenta una fuerza de tipo Lorentz en el plano sobre el que se mueven. Éste dispositivo está diseñado de tal forma que los efectos de borde impidan que haya grandes pérdidas de haz debido a choques con los extremos.

En seguida del sistema de inyección, se encuentra la *zona del acelerador*. Éste es del tipo electrostático y consta de tres partes: tubo de aceleración de baja energía, canal de stripping, en donde hay una terminal cargada positivamente, y tubo de aceleración de alta energía. La función de ambos tubos de aceleración es regular el gradiente de potencial electrostático entre la línea de análisis, que se sitúa a tierra y la terminal [24], estos están formados por una serie de electrodos unidos que a su vez producen un efecto de focalización a la entrada y desfocalización

a la salida.

Los iones entran al primer tubo de aceleración teniendo carga negativa, por lo que la terminal situada a la mitad del acelerador los atrae provocando la primera aceleración. Es en la terminal donde se lleva a cabo el proceso de *stripping*, que consiste en hacer chocar el haz de iones con un gas situado en uno de los conductos de la terminal para provocar un cambio de carga (ecuación 4-1) negativa a positiva.

$$E = \frac{M(eV_0 + eV_T)}{M_0} + qeV_T \quad (4-1)$$

En donde V_T es el voltaje de la terminal, V_0 el voltaje de la fuente, M y M_0 son las masas del núcleo de interés y del ion inyectado respectivamente, q el estado de carga y e la carga del electrón. En el caso de LEMA el gas utilizado es Argón. Se muestra un esquema del proceso en la figura 4-12. Además, es importante mencionar que esta parte del arreglo elimina moléculas contaminantes que hayan logrado escapar de los primeros filtros electromagnéticos, esto debido a que al pasar por el proceso de stripping las fuerzas coulombianas hacen que estas moléculas se rompan en fragmentos más pequeños y en consecuencia su masa ya no es igual a la de los iones que se quiere seleccionar.

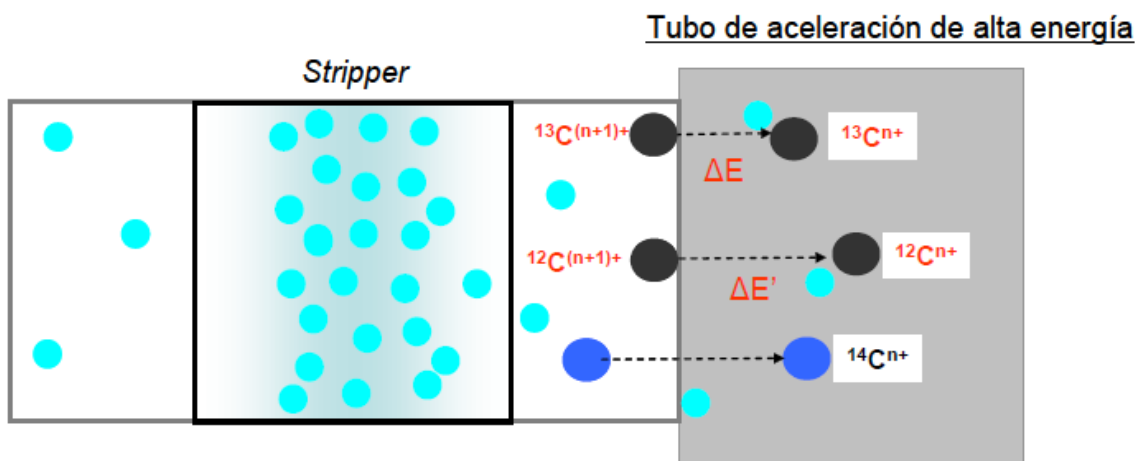


Figura 4-12: Esquema del cambio de carga en los aniones dentro del canal de stripping [24]

El campo eléctrico en la terminal se mantiene constante gracias a un generador de cascada tipo Cockcroft-Walton (Figura 4-13). Como resultado del cambio de carga, el haz ahora es repelido por la terminal y acelerado en el segundo tubo y hacia la salida del mismo.

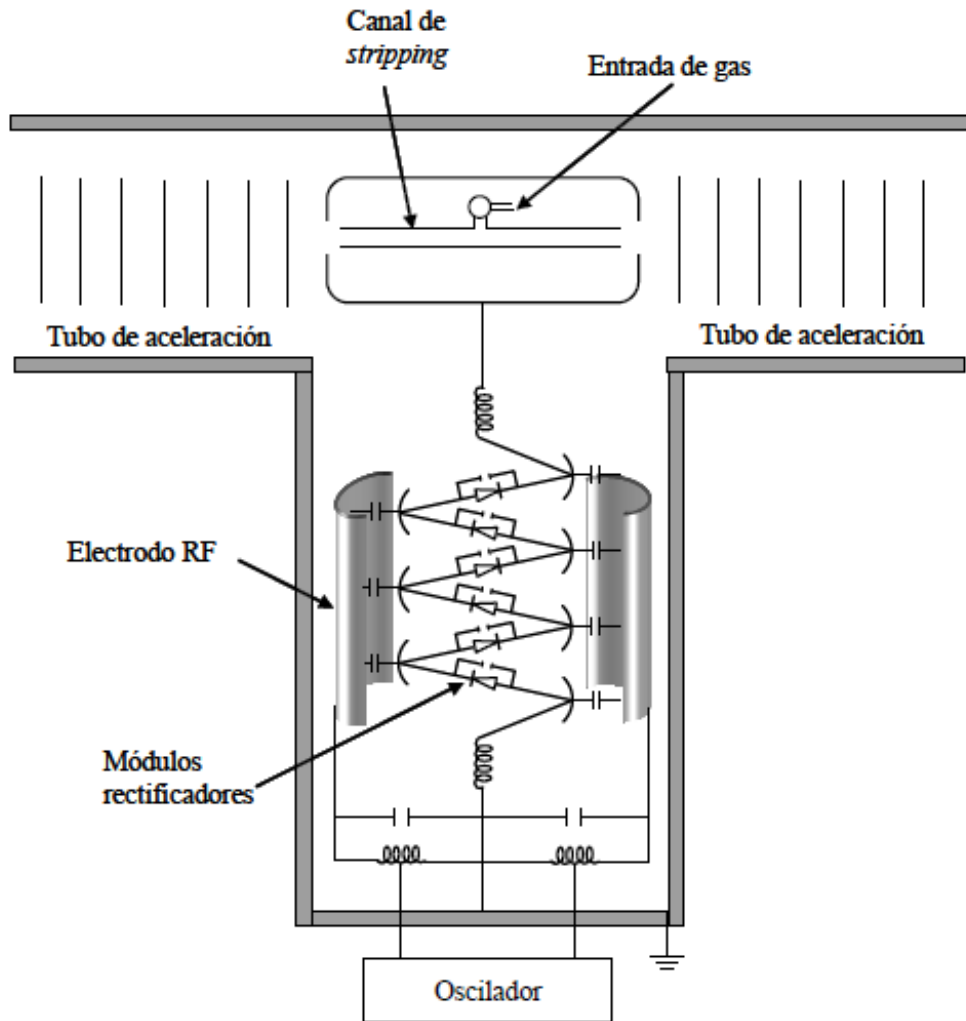


Figura 4-13: Esquema del mecanismo Cockcroft-Walton para un acelerador tipo Tandem. Finkel y Suter 1993

Al salir de la zona del acelerador, se encuentra la *zona de alta energía* donde el haz ahora formado por cationes con diferentes energías y con un diámetro y dispersión angular grandes, nuevamente atraviesa una serie de filtros para separarlos de acuerdo a su masa. Como primer elemento en esta parte se encuentra una lente cuadrupolar cuya función es la de enfocar el

haz. Esta lente está formada por cuatro electrodos acomodados en forma de cuadrado y con potenciales eléctricos opuestos en los electrodos enfrentados de tal forma que las líneas de campo son transversales y provocan un enfoque en una dirección y desenfoque en la otra, por ello es necesario hacer pasar al haz por un segundo lente cuadrupolar cuyos gradientes de campo sean opuestos al primero. Debido a que este tipo de lentes no distinguen masas, el haz atraviesa posteriormente un deflector magnético y un ESA.

Tomando en cuenta la energía de los cationes que forman el haz (ecuación 4-1) con la trayectoria que describen debido al campo magnético aplicado por el deflector magnético (ecuación 4.4), es posible obtener la ecuación 4-2 que depende de la carga de cada uno de los iones.

$$\rho = \sqrt{\frac{2ME}{qB}} = \sqrt{2\frac{M}{qB^2} \left(\frac{M(eV_0 + eV_T)}{M_0} + qeV_T \right)} \quad (4-2)$$

Para la medición de ^{14}C con AMS, es necesario también detectar y medir los isotopos estables (^{12}C y ^{13}C) para hacer las normalizaciones necesarias, por ello al salir del deflector magnético, están colocadas dos jaulas de Faraday (figura 4-14) que los detectan según la trayectoria que siguen. Estos dispositivos consisten en un tubo metálico en forma de cilindro dentro del cual el haz es frenado generando cierta carga que a su vez es integrada y detectada.

Finalmente se encuentra el sistema de detección para el ^{14}C que consta de un detector de gas cuyas moléculas son ionizadas al interactuar con el haz incidente y mediante la aplicación de un campo eléctrico, los electrones liberados son re dirigidos hacia una pared de la cámara donde la carga total es medida. Esto resulta efectivo ya que solo existe un electrón liberado por cada átomo de ^{14}C que entra al detector debido a que la energía con la que ingresan no es suficiente para que existan segundas ionizaciones. La energía depositada es cuantificada mediante la fórmula de pérdida de energía (ecuación 4-3) debido al frenado de cada partícula, ésta depende del número atómico (z) por lo que es también un filtro a otras partículas interferentes.

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi}{m_e c^2} \frac{nz^2}{\beta^2} \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 \left[\ln \frac{2m_e c^2 \beta^2}{I(1-\beta^2)} - \beta^2 \right] \quad (4-3)$$

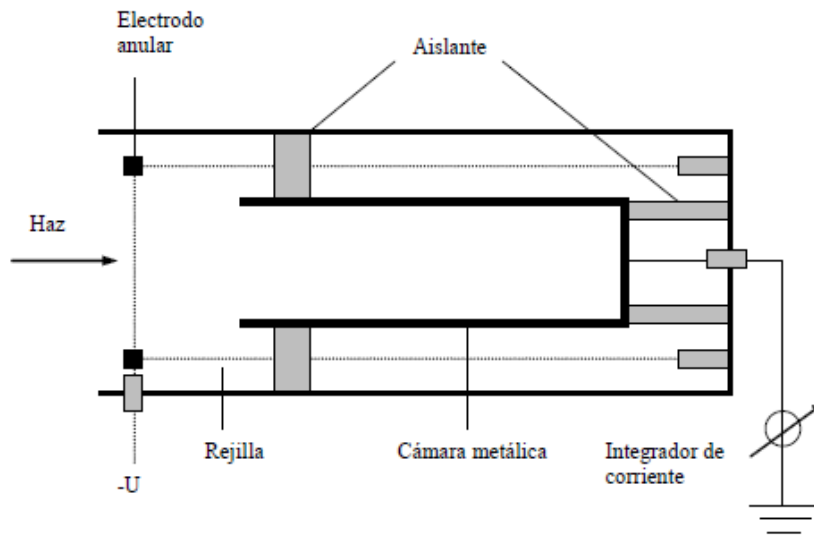


Figura 4-14: Esquema de una cámara de Faraday en la que son detectados los isótopos estables.

En la ecuación de pérdida de energía, se toma c la velocidad de la luz, m_e la masa del electrón, ϵ_0 la permitividad en el vacío, $\beta = v/c$ y n la densidad electrónica del material que a su vez está dada por:

$$n = \frac{N_a z \rho}{M_u} \quad (4-4)$$

Donde N_a es la constante de Avogadro y M_u la constante de masa molar.

De esta forma son detectados los tres isótopos del carbono y los datos obtenidos son analizados posteriormente.

4.5.1. Calibración del sistema

Fuente de iones

El Cs se encuentra en estado líquido en el reservorio, pero es calentado a una temperatura en el intervalo de 90 a 110°C para evaporarse y adherirse al ionizador. El ionizador que inicialmente se encuentra a -27.72 kV, recibe una corriente de 17.9 A para elevar su temperatura a 110°C y de esta forma provocar la formación de iones de Cs^+ debidos al fenómeno de termoionización

sobre el Cs. El porta-cátodos se encuentra a un potencial de -35kV, por lo que atrae los iones del Cs provocando la erosión catódica mencionada anteriormente y éste a su vez provoca la formación de iones y moléculas tanto positivas como negativas, de las cuales solo las negativas X^- avanzan al cono de extracción; en él se hacen variaciones del voltaje de sus componentes para encontrar los valores de transmisión óptima del haz (Tabla 4-2):

Elemento	Rango de variación	Valor óptimo
Y-Steerer	-200 a 200 V	-20.7 V
Lente Einzel	8 a 25 kV	16.500 kV

Tabla 4-2: Datos de la calibración de los elementos en el cono de extracción.

Zona de baja energía

Nuevamente, los voltajes de los elementos en esta sección son variados para seleccionar los valores óptimos de transmisión (Tabla 4-3). En el caso del imán de baja energía, se hace una variación en la corriente en el rango de 48.5 a 49.1 A, encontrándose como valor óptimo la corriente a 48.79 A. Debe tomarse en cuenta que es necesario medir a los tres isótopos del carbono; esto implica una variación extra en el sistema que no afecta los parámetros del deflector magnético (calibrado de para medir el ^{14}C) ya que el sistema de inyección secuencial, está formado por dos placas electrostáticas sometidas a un potencial externo, que depende de cuál de los isótopos estable (^{12}C ó ^{13}C) quiere medirse.

Elemento	Rango de variación	Valor óptimo
Deflector electrostático	3.96 a 3.99 kV	3.97 kV
Y-Steerer	-200 a 200V	-75.9 V
Lente Einzel	10 a 20 kV	17.586 kV

Tabla 4-3: Datos de la calibración de los elementos en la zona de baja energía.

Además, debido a que las propiedades de transmisión del haz dependen del estado de carga de las partículas que lo conforman, es necesario hacer una calibración de la presión del Ar

(gas stripper), eligiendo aquella en la que haya más transmisión de partículas. En LEMA se ha calculado para el estado 2+ la presión de $18 \mu\text{b}$ en la que se obtiene una transmisión de haz del 55 %.

Zona de alta energía

La calibración se hace de la misma forma que la zona de baja energía, en este caso debe encontrarse la máxima transmisión de los tres isótopos ya que estos son detectados casi simultáneamente. Al variar la corriente en el intervalo entre 151.9 A y 154.0 A, se ha encontrado la transmisión óptima en 152.769 A.

Detector

Debido a que la detección de las partículas se hace midiendo su pérdida de energía, el parámetro a variar en esta zona es la presión del gas isobutano ubicado en la cámara de ionización. De esta forma, es posible distinguir entre el ^{14}C y su isóbaro $^7\text{Li}_2$. Además en esta parte también se encuentra un Y-Steerer cuyo voltaje también varía entre -500 a 500 V y el valor óptimo está en -20V.

4.6. Tratamiento de datos de datación con ^{14}C

Posterior a la obtención de datos en el acelerador, se realiza su análisis usando los métodos descritos en 1.5.

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1. Relaciones entre parámetros para analizar la preservación de colágeno

Se muestran las gráficas obtenidas del análisis elemental correspondiente a 54 huesos en LEMA. Se extrajo el colágeno de estas muestras usando el método detallado en 4.2 y posteriormente se hizo el análisis elemental del colágeno UF que generalmente es el utilizado para las dataciones.

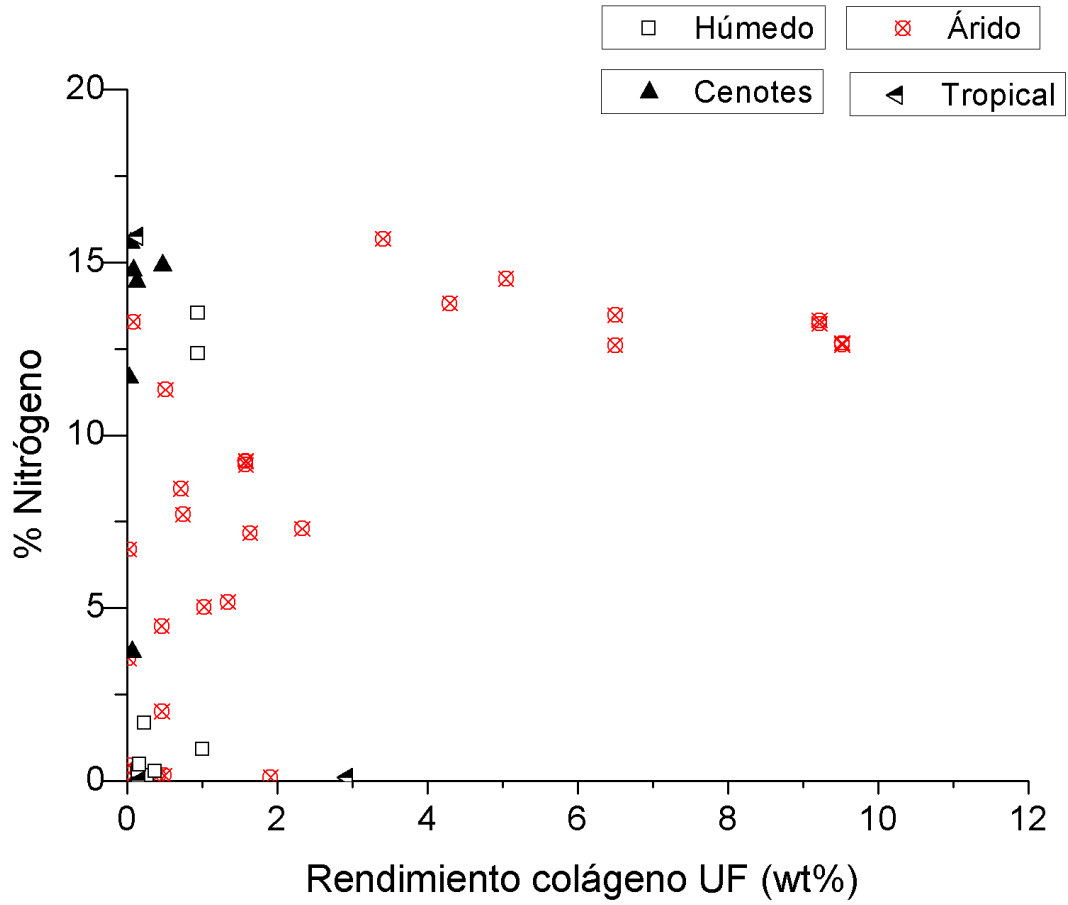


Figura 5-1: Gráfica de %N y rendimiento de colágeno UF pertenecientes a los datos listados en el Apéndice B-1

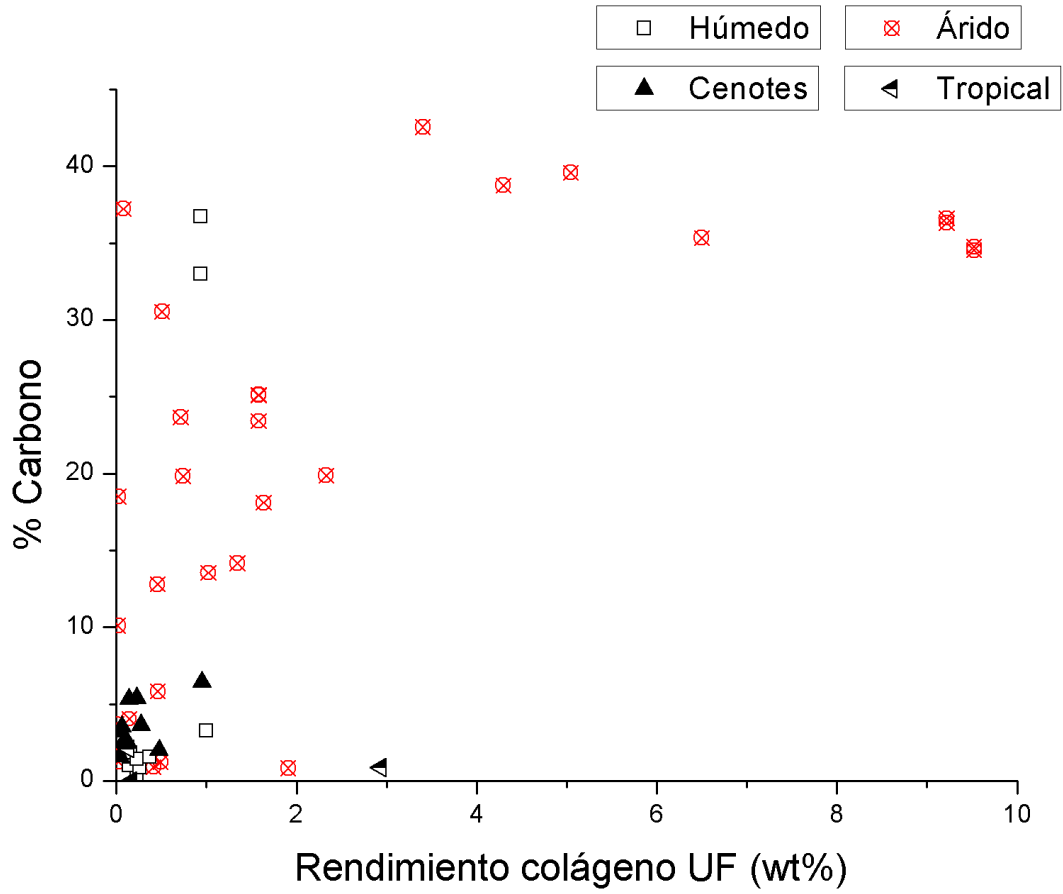


Figura 5-2: Gráfica de %C y rendimiento de colágeno UF listados en el Apéndice B-2

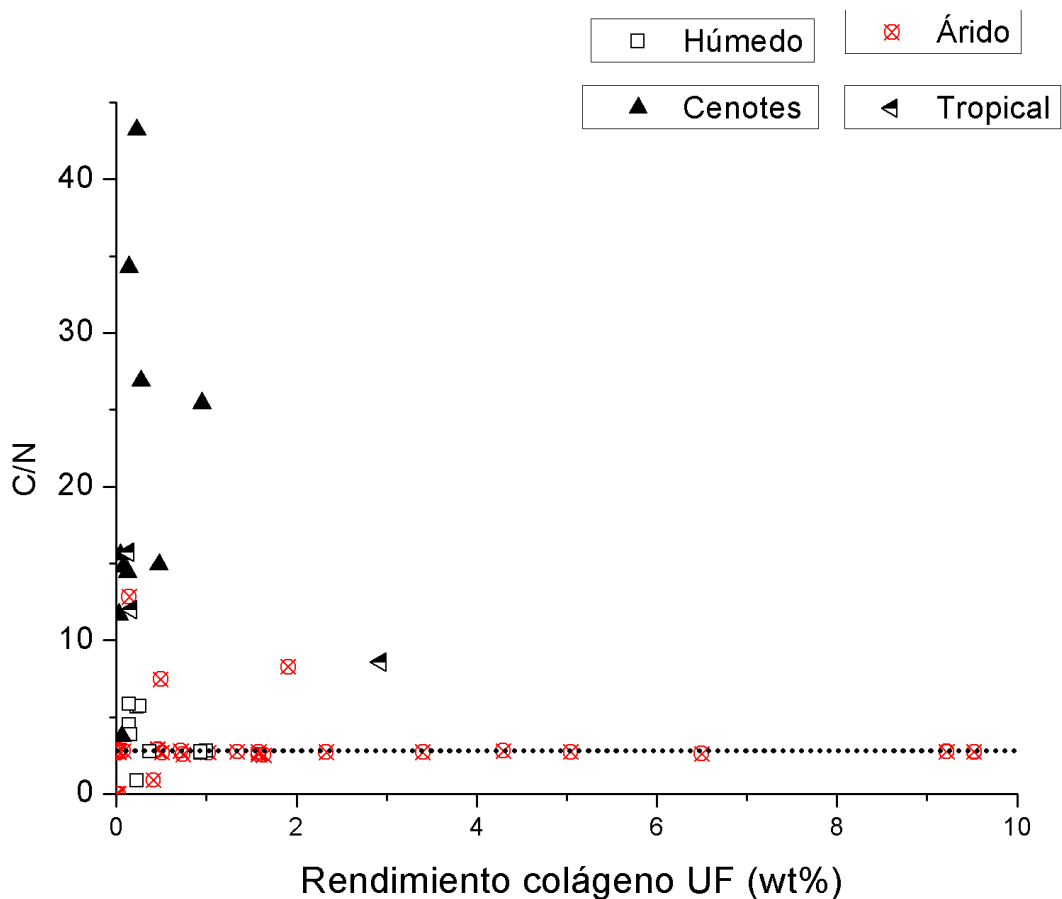


Figura 5-3: Gráfica de C/N y rendimiento de colágeno UF. Datos en la tabla B-3

La figura 5-1 muestra los datos obtenidos para el %N de las muestras de hueso contra el rendimiento de colágeno UF, en ella no se observa una relación clara entre las dos características. Se podría pensar que después de un rendimiento de 2 %, el contenido de nitrógeno se estabiliza en valores aproximadamente de 12 a 14 %, sin embargo, el número de muestras que lo indican es pequeño en comparación con el número total de muestras analizadas, por lo que este comportamiento no se puede asegurar.

Por su parte, en la figura 5-2 se grafican los porcentajes de carbono contra el rendimiento. El comportamiento es similar al discutido en el párrafo anterior; parecería que para rendimientos mayores a 2 %, los valores de %C caen dentro del intervalo de 35 a 45 %, pero nuevamente es apresurado afirmar que esto sucede siempre debido al reducido número de muestras que

cumplen esto.

La figura 5-3 representa la relación entre el rendimiento de colágeno UF y la razón C/N. Se puede observar que este factor es muy variable en rendimientos menores a 1 %, pero a mayores valores se estabiliza alrededor de $C/N = 2.79$ (línea punteada). Este resultado es importante debido a que el comportamiento de los datos coincide con trabajos ya publicados en los que se reporta estabilización del parámetro pero en valores aproximados a 5 [1, 2]. La discrepancia entre estos valores se puede justificar con la diferencia entre contextos geográficos de las zonas de estudio.

Se puede observar en las tres gráficas que aquellas muestras pertenecientes a zonas áridas (color rojo), presentan los mayores rendimientos de colágeno.

5.2. Efecto del proceso de gelatinización en las muestras

En la gráfica 5-4 se muestran los datos listados en el apéndice C en una tabla con las relaciones C/N de 37 muestras de hueso antes de la extracción del colágeno (hueso entero) y después de la extracción (colágeno UF). Se puede observar que aunque inicialmente algunos factores son muy altos, el procesado de la muestra provoca un descenso en el valor hasta situarlo dentro del intervalo de 2.7 a 3.7 lo cual nos lleva a pensar que efectivamente el hueso se libera de carbonatos externos a su composición natural (contaminación).

No se puede observar algún patrón que indique si en general las muestras provenientes de cierto sitio tendrán una buena preservación de colágeno o no, sin embargo como se esperaba, aquellos huesos que estaban enterrados en suelo de zonas áridas parecen tener mejores rendimientos. En este tipo de análisis se puede ver que el ambiente de enterramiento no es el único factor que influye en el estado en el que se encuentra la muestra.

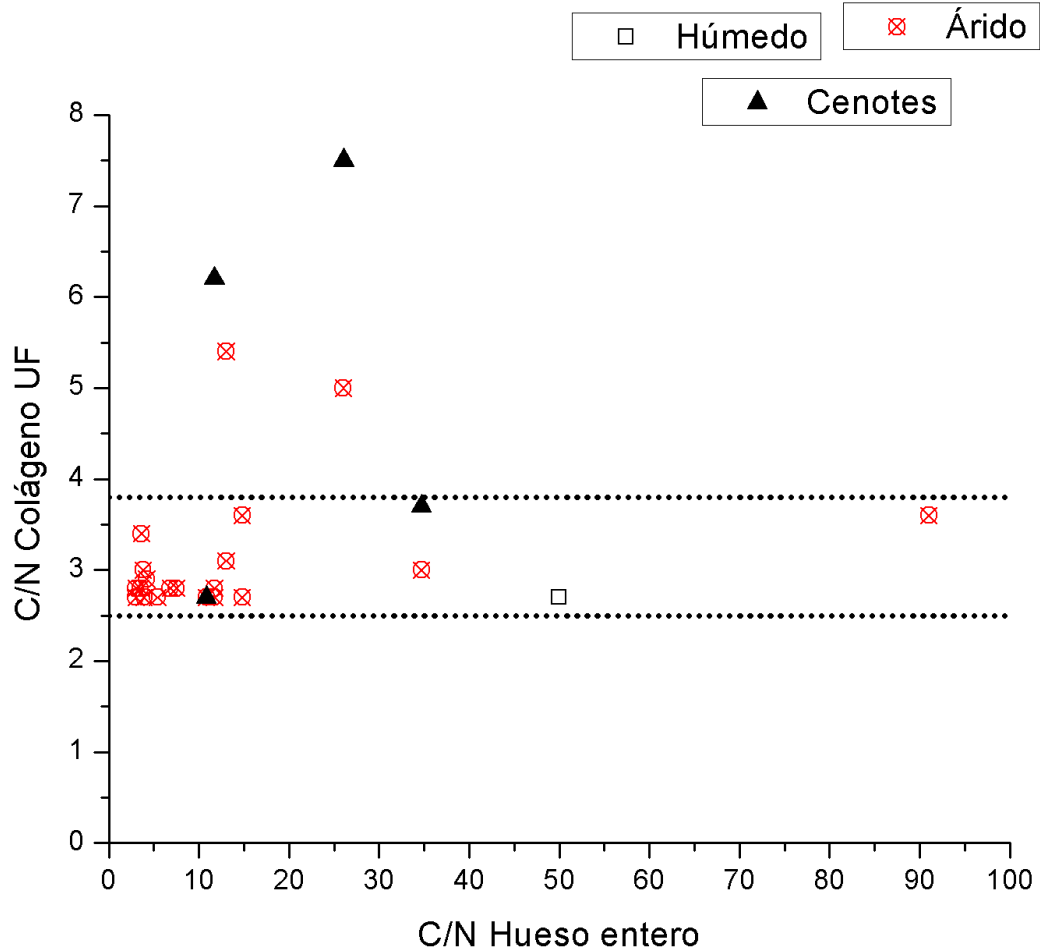


Figura 5-4: Gráfica comparación entre el factor C/N de algunas muestras LEMA antes y después de la extracción de colágeno UF. Datos en la tabla contenida en el Apéndice C-1.

5.3. Datación de diferentes fracciones de hueso

Para esta parte del trabajo se dataron diferentes fracciones obtenidas a lo largo de las etapas de preparación de las muestras. Se lograron obtener las comparaciones mostradas en las tablas 5-1 y 5-2. En la primera se presentan aquellas muestras cuyas fracciones disponibles arrojaron fechas que se encuentran dentro del 5% de incertidumbre junto con sus valores de C/N. Es distinguible que los colágenos correspondientes a estas muestras, tienen un valor de C/N entre 2.7 y 7.3, en donde el rango del colágeno UF se redujo a valores de C/N que varían de 2.7

a 2.8. Además como es de esperarse este factor es mayor para el colágeno total ya que es la primera fracción obtenida durante la limpieza, por lo tanto todavía contiene proteínas diferentes al colágeno. Por su parte el colágeno insoluble es una fracción conformada por *colágeno roto* o desnaturalizado y como se observa en esta tabla, su factor C/N no cambia mucho respecto al del colágeno UF. Se puede observar además, que el rendimiento de colágeno para estas muestras es muy variable; hay algunos muy altos (mayores a 1 %) y otros muy bajos como el de la muestra LEMA 278 (menor a 0.1 %), por lo que se requeriría una preparación adicional para asegurarse que el resultado es confiable. Que las fechas de las fracciones coincidan, puede indicar que las muestras se encuentran en buen estado de preservación y que el proceso de extracción de colágeno es exitoso.

Tabla 5-1: Comparación de muestras LEMA correspondientes a diferentes fracciones de hueso en las que sí se obtuvo coincidencia entre fechas. Se presentan las fechas radiocarbono en años antes del presente y el error de 1 sigma ^{14}C (a.P. $\pm 1\sigma$) y el factor C/N de cada una, denotándose NA si no fue posible obtener esa fracción

Número LEMA	Edad ^{14}C (a.P. $\pm 1\sigma$) C/N	Colágeno total	Colágeno UF	Colágeno insoluble	Rendimiento colágeno UF
93	Edad ^{14}C C/N	1580 \pm 30 2.8	1533 \pm 35 2.8	1582 \pm 35 3.5	4.295
278	Edad ^{14}C C/N	NA	932 \pm 30 2.7	946 \pm 30 3.2	0.022
280	Edad ^{14}C C/N	2500 \pm 30 6.44	NA	2548 \pm 30 7.3	NA
284	Edad ^{14}C C/N	NA	934 \pm 30 2.8	895 \pm 30 3.3	6.220
301	Edad ^{14}C C/N	736 \pm 40 NA	699 \pm 30 2.8	NA	1.000
303	Edad ^{14}C C/N	570 \pm 30 2.95	642 \pm 35 2.71	NA	1.000
311	Edad ^{14}C C/N	371 \pm 30 3.25	466 \pm 30 2.72	355 \pm 30 3.05	2.329

Por otro lado, en la segunda tabla se presentan aquellas muestras de las que no se obtuvo similitud entre las fechas de sus fracciones, el colágeno UF tiene muy bajo rendimiento o incluso no hubo suficiente para ser fechado, lo cual indica que el estado de preservación es malo. Por

otra parte, el factor C/N para dichas muestras es en general mayor que el observado en la tabla 5-1 y la mayoría de estos valores aumenta en el colágeno total respecto al colágeno UF. Esto se podría deber a contaminación adquirida durante la extracción o errores en el mismo proceso.

Tabla 5-2: Comparación de muestras LEMA correspondientes a diferentes fracciones de hueso en las que no se obtuvo coincidencia entre fechas. Se presentan las fechas radiocarbono en años antes del presente y el error de 1 sigma ^{14}C (a.P. $\pm 1\sigma$) y el factor C/N de cada una, denotándose NA si no fue posible obtener esa fracción

Número LEMA	Edad ^{14}C (a.P. $\pm 1\sigma$) C/N	Colágeno total	Colágeno UF	Colágeno insoluble	Rendimiento colágeno UF
103	Edad ^{14}C C/N	1967 \pm 30 6.07	9108 \pm 30 7.5	NA	0.491
254	Edad ^{14}C C/N	NA	NA	9688 \pm 35 27	NA
256	Edad ^{14}C C/N	NA	NA	9318 \pm 30 15.1	NA
257	Edad ^{14}C C/N	NA	NA	13138 \pm 35 16.4	NA
258	Edad ^{14}C C/N	NA	NA	7805 \pm 30 18.6	NA
259	Edad ^{14}C C/N	NA	NA	8211 \pm 30 11.4	NA
260	Edad ^{14}C C/N	NA	NA	10849 \pm 40 24.4	NA
261	Edad ^{14}C C/N	NA	NA	8228 \pm 35 49.11	NA
262	Edad ^{14}C C/N	NA 6.4	NA 8.3	9305 \pm 35 7.3	NA
286	Edad ^{14}C C/N	9406 \pm 30 61	NA	9272 \pm 30 17	NA
287	Edad ^{14}C C/N	NA	2640 \pm 30 2.9	3194 \pm 30 3.7	0.018
305	Edad ^{14}C C/N	403 \pm 30 3.2	3170 \pm 170 3.6	NA	0.080

Es importante mencionar que no se pudieron obtener fracciones de todas las muestras debido principalmente a la poca cantidad proporcionada. Aunque el rendimiento de colágeno UF era adecuado y las relaciones C/N también, dentro del intervalo de 2.7 a 3.6, valores que

demuestran una buena preservación de colágeno en hueso, no se pudo obtener la cantidad de colágeno mínima necesaria para el análisis de radiocarbono por EMA.

5.4. Conclusiones

- En este trabajo se realizó la caracterización del estado de preservación de los huesos que se han recibido en el LEMA para su datación con ^{14}C . Estas muestras provienen de distintos lugares de la República Mexicana en los que las condiciones en las que quedaron enterradas o depositadas son diferentes.
- Se determinó el estado de preservación para cada hueso y su colágeno extraído, a través de su %N, %C, C/N y su rendimiento de colágeno obtenido.
- Aproximadamente el 84 % del total de las muestras tuvo un rendimiento de colágeno UF por debajo del 3 %, y para el 74 % de ellas se obtuvo un rendimiento menor a 1 %, pero esto no impide que el porcentaje de carbono y nitrógeno sea alto para algunas de ellas.
- Existe un valor al cual el C/N se estabiliza y este depende tanto del rendimiento del colágeno UF como de la región de la que provienen las muestras. El valor promedio para la estabilización de este factor es de 2.79 con rendimientos al rededor de 2.57 %, lo que indica una buena preservación de colágeno. Sin embargo, no parece haber relación clara entre el rendimiento de colágeno UF y los factores escogidos para el análisis (%N, %C y C/N).
- La ultrafiltración de las muestras implica la eliminación de algunos polipéptidos de cadenas cortas. Esto tiene como consecuencia la disminución del rendimiento de colágeno pero una notable mejoría en la razón C/N indicando la eliminación exitosa de carbonatos contaminantes.
- Se comparó la edad radiocarbono de 3 fracciones de colágeno obtenido durante el procesamiento de los huesos. La primera: *colágeno total*, la segunda: *colágeno ultrafiltrado* y

la tercera: *colágeno insoluble*.

- La comparación entre estas fracciones de hueso ayudó a entender la importancia del rendimiento de colágeno y la relación C/N, factores esenciales a medir en todas las muestras de nuestro laboratorio y que por ende podría ser un parteaguas para el establecimiento de las condiciones que deben cumplir los huesos que pueden ser exitosamente fechados: luego de la obtención de cada una de las fracciones, se deben cumplir tres condiciones para que las edades radiocarbono coincidan:
 1. Que la razón C/N para el colágeno total sea mayor a la del colágeno UF y que esta última se encuentre en el intervalo de 2.7 - 2.8.
 2. Que las razones C/N de las fracciones obtenidas no varíe demasiado (no más de 5 unidades).
 3. Que el rendimiento de colágeno UF sea $\geq 1\%$.
- La mayoría de los huesos encontrados en zonas áridas arrojan buen rendimiento de colágeno sin embargo, estas condiciones climáticas no son una garantía que demuestren un buen estado de preservación. Solo una cuarta parte de aquellos que fueron hallados en zonas húmedas o tropicales presentan un buen rendimiento de colágeno UF. En el caso de los cenotes, los huesos están mucho más deteriorados con rendimientos de colágeno UF muy bajos, además todos entran en el grupo de aquellos de los que sólo pudo fecharse el colágeno insoluble.
- Los resultados de este trabajo muestran la importancia que tienen los contextos arqueológicos de los que provienen las muestras, por lo que en el registro de éstas es necesario incluir toda la información posible sobre sus condiciones de depósito para poder hacer una correcta interpretación de los resultados.
- Éste es el primer estudio en México en el que se intenta caracterizar muestras de huesos para análisis de radiocarbono con EMA. Todavía queda mucho trabajo a futuro y para una mejor comprensión de los procesos de contaminación y diagénesis en huesos, sería útil

incorporar otras técnicas que complementen la información obtenida en este trabajo tales como espectroscopías infrarroja y Raman, análisis con rayos X, microscopía electrónica entre otras.

Apéndice A

Medida de ^{14}C en términos de actividad

Tomando A_{abs} como la actividad hipotética del carbono atmosférico en 1950 normalizada a $\delta^{13}\text{C}=-25\text{‰}$ y medida en 1950, podemos expresar ésta como la actividad que tendría el carbono atmosférico desde cualquier año de medida y a la actividad que habría tenido en 1950, esto mediante la expresión A-1.

$$A_{abs} = A_{1950[\delta^{13}\text{C}=-25]} e^{\lambda(y-1950)} \quad (\text{A-1})$$

Por su parte, la actividad de cualquier muestra A_m debe ser normalizada a $\delta^{13}\text{C}=-25\text{‰}$, esto mediante la siguiente relación:

$$A_{mN} = A_m \left[\frac{1 - \frac{25}{1000}}{1 + \frac{\delta^{13}\text{C}_m}{1000}} \right]^2 \quad (\text{A-2})$$

En donde el término elevado al cuadrado representa la corrección general. Normalizando la actividad del OXAI a 95 % de su actividad medida antes de las pruebas nucleares con $\delta^{13}\text{C}=-19\text{‰}$ y a su vez, al estándar OXAII normalizado a $\delta^{13}\text{C}=-25\text{‰}$, se tiene el valor para un estándar absoluto A_{ON} dado como:

$$A_{ON} = 0.95 A_{OXAI} \left[\frac{1 - \frac{19}{1000}}{1 + \frac{\delta^{13}\text{C}_{OXAI}}{1000}} \right]^2 = 0.7459 A_{OXAII} \left[\frac{1 - \frac{25}{1000}}{1 + \frac{\delta^{13}\text{C}_{OXAII}}{1000}} \right]^2 \quad (\text{A-3})$$

Por lo que en términos de actividad radiactiva, la edad radiocarbono en años aP se expresa como:

$$\text{Edad radiocarbono} = -8033 \ln \frac{A_{mN}(1950)}{A_{ON}(1950)} \quad (\text{A-4})$$

Además, tomando la ecuación A-1 para A_{ON} , obtenemos

$$A_{abs} = A_{ON} \exp \lambda(y - 1950) \quad (\text{A-5})$$

con y el año en el que se hace la medición y $1/\lambda = 8267$ años

$$0.95 A_{OXAI[-19]} = 0.7459 A_{OXAI[-25]} \quad (\text{A-6})$$

de donde obtenemos

$$A_{1950[-25]} = 0.95 A_{OXAI[-19]} = 0.7459 A_{OXAI[-25]} \quad (\text{A-7})$$

Apéndice B

Datos de las relaciones entre parámetros de preservación de colágeno

Tabla B-1: Datos sobre el %N correspondientes a la gráfica 5-1

Clave LEMA	Rendimiento colágeno	%N
93.1.1	4.295	13.81
103.1.1	0.491	0.16
112.1.1	1.907	0.10
114.1.1	0.951	0.25
141.1.1	0.138	0.15
142.1.1	0.125	0.17
143.1.1	0.273	0.14
145.1.1	0.227	0.12
146.1.1	0.473	0.13
191.1.1	0.712	8.45
192.1.1	1.022	5.03
193.1.1	1.578	9.14
193.1.2	1.578	9.26
193.1.3	1.578	9.24
194.1.1	0.460	2.01
195.1.1	0.739	7.71
196.1.1	1.634	7.17
198.1.1	0.458	4.48
225.1.1	6.497	13.47

Clave LEMA	Rendimiento colágeno	%N
225.1.2	6.497	12.60
226.1.1	9.219	13.32
226.1.1	9.219	13.22
227.1.1	9.522	12.62
227.1.2	9.522	12.67
233.1.1	0.021	0.00
234.1.1	0.030	0.27
252.1.1	0.062	0.10
257.1.1	0.042	0.10
278.1.1	0.022	6.70
279.1.1	0.021	0.45
284.1.1	0.078	13.28
285.1.1	1.341	5.17
286.1.1	0.002	0.00
287.1.1	0.018	3.55
296.1.1	0.231	0.07

Clave LEMA	Rendimiento colágeno	%N
297.1.1	0.140	0.22
297.1.2	0.265	0.15
298.1.1	0.369	0.27
299.1.1	0.140	0.27
299.1.1	0.161	0.47
300.1.2	0.231	1.67
301.1.1	1.00	0.91
303.1.1	0.940	12.37
303.1.2	0.940	13.53
305.1.1	0.080	0.610
306.1.1	0.412	0.15
311.1.1	2.329	7.30
314.1.2	2.932	0.10
315.1.2	0.163	0.01
316.1.1	0.622	2.76
319.1.1	5.043	14.52
320.1.1	0.507	11.32
321.1.1	3.403	15.68
322.1.1	0.142	0.31

Tabla B-2: Datos sobre el % C correspondientes a la gráfica 5-2

Clave LEMA	Rendimiento colágeno	%C
93.1.1	4.295	38.76
103.1.1	0.491	1.22
112.1.1	1.907	0.83
114.1.1	0.951	6.43
141.1.1	0.138	5.31
142.1.1	0.125	2.48
143.1.1	0.273	3.64
145.1.1	0.227	5.39
146.1.1	0.473	2.00
191.1.1	0.712	23.67
192.1.1	1.022	13.55
193.1.1	1.578	23.42
193.1.2	1.578	25.15
193.1.3	1.578	25.10
194.1.1	0.460	5.83
195.1.1	0.739	19.83
196.1.1	1.634	18.11
198.1.1	0.458	12.80
225.1.1	6.497	35.34
225.1.2	6.497	35.34
226.1.1	9.219	36.62
226.1.2	9.219	36.32
227.1.1	9.522	34.54
227.1.2	9.522	34.76
233.1.1	0.021	1.95
234.1.1	0.030	3.19
252.1.1	0.062	3.51

Clave LEMA	Rendimiento colágeno	%C
257.1.1	0.042	1.61
278.1.1	0.022	18.52
279.1.1	0.021	1.23
284.1.1	0.078	37.24
285.1.1	1.341	14.17
286.1.1	0.002	3.72
287.1.1	0.018	10.10
296.1.1	0.231	0.38
297.1.1	0.140	0.97
297.1.2	0.265	0.85
298.1.1	0.369	1.56
299.1.1	0.140	1.56
299.1.1	0.161	1.81
300.1.2	0.231	1.41
301.1.1	1.00	3.23
303.1.1	0.940	32.99
303.1.2	0.940	36.71
305.1.1	0.080	2.20
306.1.1	0.412	0.90
311.1.1	2.329	19.88
314.1.2	2.932	0.88
315.1.2	0.163	0.01
316.1.1	0.622	0.53
319.1.1	5.043	39.59
320.1.1	0.507	30.55
321.1.1	3.403	42.55
322.1.1	0.142	4.03

Tabla B-3: Datos sobre el cociente C/N correspondientes a la gráfica 5-3

Clave LEMA	Rendimiento colágeno	C/N
93.1.1	4.295	2.81
103.1.1	0.491	7.46
112.1.1	1.907	8.28
114.1.1	0.951	2.9
141.1.1	0.138	34.29
142.1.1	0.125	14.44
143.1.1	0.273	26.87
145.1.1	0.227	43.20
146.1.1	0.473	14.91
191.1.1	0.712	2.80
192.1.1	1.022	2.69
193.1.1	1.578	2.56
193.1.2	1.578	2.72
193.1.3	1.578	2.72
194.1.1	0.460	2.90
195.1.1	0.739	2.57
196.1.1	1.634	2.52
198.1.1	0.458	2.85
225.1.1	6.497	2.62
225.1.2	6.497	2.62
226.1.1	9.219	2.75
226.1.2	9.219	2.75
227.1.1	9.522	2.74
227.1.2	9.522	2.74
233.1.1	0.021	0.00
234.1.1	0.030	6.20
252.1.1	0.062	3.73
257.1.1	0.042	16.70

Clave LEMA	Rendimiento colágeno	C/N
278.1.1	0.022	2.76
279.1.1	0.021	2.69
284.1.1	6.220	2.80
285.1.1	1.341	2.74
286.1.1	0.002	0.00
287.1.1	0.018	2.85
296.1.1	0.231	5.65
297.1.1	0.140	4.49
297.1.2	0.265	5.68
298.1.1	0.369	5.81
299.1.1	0.140	5.81
299.1.1	0.161	3.85
300.1.2	0.231	0.85
301.1.2	1.00	2.80
303.1.1	1.00	2.67
303.1.2	1.00	2.71
305.1.1	0.080	3.20
306.1.1	0.412	5.92
311.1.1	2.329	2.72
314.1.2	2.932	8.57
315.1.2	0.163	0.54
316.1.1	0.622	15.68
319.1.1	5.043	2.73
320.1.1	0.507	2.70
321.1.1	3.403	2.71
322.1.1	0.142	12.83

Apéndice C

Comparación del factor C/N

Tabla C-1: Datos correspondientes a la gráfica 5-4

Número de muestra	C/N Hueso entero	C/N colágeno
24	11.7	2.8
27	13.0	3.1
28	26.0	5.0
29	34.7	3.0
30	14.8	2.7
31	11.7	2.7
61	14.8	3.6
90	3.8	3.0
104	7.5	2.8
105	6.8	2.8
106	91.0	3.6
107	10.8	2.7
108	5.4	2.7
109	3.0	2.8
112	3.0	2.7
114	4.2	2.9
134	3.0	2.7
135	3.6	3.4
148	15.6	2.7

Número de muestra	C/N Hueso entero	C/N colágeno
234	11.7	6.2
235	13.0	5.4
236	26.1	7.5
252	34.7	3.7
262	10.8	2.7
282	14.8	2.7
284	3.5	2.8
285	3.9	2.7

Bibliografía

- [1] Fiona Brock, Thomas Higham, and C Bronk Ramsey. Pre-screening techniques for identification of samples suitable for radiocarbon dating of poorly preserved bones. *Journal of Archaeological Science*, 37(4):855–865, 2010. [Citado en las págs. viii, 31 y 59.]
- [2] Fiona Brock, Rachel Wood, Thomas FG Higham, Peter Ditchfield, Alex Bayliss, and Christopher Bronk Ramsey. Reliability of nitrogen content ($\% \text{ n}$) and carbon: nitrogen atomic ratios (c: N) as indicators of collagen preservation suitable for radiocarbon dating. *Radiocarbon*, 54(3-4):879–886, 2012. [Citado en las págs. viii, 33 y 59.]
- [3] Irka Hajdas. Radiocarbon dating and its applications in quaternary studies. *Eiszeitalter und Gegenwart Quaternary Science Journal*, 57(2):24, 2008. [Citado en las págs. ix, 5 y 6.]
- [4] GE Kocharov. Radiocarbon and astrophysical-geophysical phenomena. In *Radiocarbon After Four Decades*, pages 130–145. Springer, 1992. [Citado en la pág. 3.]
- [5] Royal Ervin Taylor. Radiocarbon dating: an archaeological perspective. In *Archaeological chemistry II. Based on a symposium sponsored by the division of the history of chemistry at the 174th meeting of the American Chemical Society, Chicago, August 31-Sept. 1, 1977*, pages 33–69. American chemical society, 1978. [Citado en las págs. 4, 5, 8, 10, 16 y 77.]
- [6] Sheridan Bowman. *Interpreting the past: radiocarbon dating*. British Museum Publications, 1990. [Citado en las págs. 7, 11, 18 y 19.]
- [7] WG Mook and HT Waterbolk. Radiocarbon dating, handbooks for archaeologists, 3. *Strasbourg: European Science Foundation*, 1985. [Citado en las págs. 7, 12, 13 y 77.]

- [8] B Philippsen. Hard water or high ages? 14c food crust analysis on mesolithic pottery from northern germany [diploma thesis]. *Faculty of Physics and Astronomy, University of Heidelberg, Germany*, 2008. [Citado en la pág. 15.]
- [9] JN Lanting and JVAN DER PLICHT. W at hebben floris v, skelet swifterbant s2 en vis otters gemeen? *Palaeohistoria*, 1996. [Citado en la pág. 15.]
- [10] ÁE Sveinbjörnsdóttir, Jan Heinemeier, and Stefan Arnorsson. Origin of 14c in icelandic groundwater. *Radiocarbon*, 37(2):551–565, 1995. [Citado en la pág. 15.]
- [11] Jeffrey Klein, Juan Carlos Lerman, PE Damon, and Elizabeth K Ralph. Calibration of radiocarbon dates; tables based on the consensus data of the workshop on calibrating the radiocarbon time scale. *Radiocarbon*, 24(2):103–150, 1982. [Citado en la pág. 16.]
- [12] Mike Walker and Michael James Cawthorne Walker. *Quaternary dating methods*. John Wiley and Sons, 2005. [Citado en las págs. 18 y 19.]
- [13] Tomasz Goslar, Maurice Arnold, Edouard Bard, Tadeusz Kuc, Mieczysław F Pazdur, Magdalena Ralska-Jasiewiczowa, Kazimierz Rozanski, Nadine Tisnerat, Adam Walanus, Bogumił Wicik, et al. High concentration of atmospheric 14c during the younger dryas cold episode. *Nature*, 377(6548):414–417, 1995. [Citado en la pág. 19.]
- [14] Kristina Stenström, Göran Skog, Elisavet Georgiadou, Johan Genberg, and Anette Johansson. A guide to radiocarbon units and calculations. *LUNFD6 (NFFR-3111)/1-17/(2011)*, 2011. [Citado en la pág. 21.]
- [15] L Wacker, M Christl, and H-A Synal. Bats: a new tool for ams data reduction. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 268(7):976–979, 2010. [Citado en la pág. 21.]
- [16] Jae-Young Rho, Liisa Kuhn-Spearing, and Peter Zioupos. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical engineering & physics*, 20(2):92–102, 1998. [Citado en la pág. 25.]

- [17] M Vallet-Regi, LM Rodriguez-Lorenzo, and AJ Salinas. Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite. *Solid State Ionics*, 101:1279–1285, 1997. [Citado en la pág. 26.]
- [18] Anat Marom, James SO McCullagh, Thomas FG Higham, Andrey A Sinitsyn, and Robert EM Hedges. Single amino acid radiocarbon dating of upper paleolithic modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(18):6878–6881, 2012. [Citado en la pág. 27.]
- [19] Jone Castaños, Xabier Murelaga, Idoia Castellanos, Ainhoa Alonso Olazabal, María Cruz Zuluaga, and Luis Angel Ortega. Evaluación del grado de diagénesis en huesos fósiles mediante espectroscopía de infrarrojos. *Geogaceta*, 49:11–14, 2010. [Citado en la pág. 29.]
- [20] Robert EM Hedges. Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 44(3):319–328, 2002. [Citado en la pág. 29.]
- [21] Gert J Van Klinken. Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science*, 26(6):687–695, 1999. [Citado en la pág. 33.]
- [22] Kenneth H Purser. Accelerators—the solution to direct ^{14}C detection. In *Proceedings of the First Conference on Radiocarbon Dating with Accelerators*, pages 1–32, 1978. [Citado en la pág. 43.]
- [23] José Manuel Gómez Guzmán et al. *Medida de ^{129}I en el Sistema de Espectrometría de Masas con Aceleradores de 1 MV del Centro Nacional de Aceleradores: Aplicación a problemas medioambientales*. PhD thesis, Universidad de Sevilla, 2010. [Citado en las págs. 45 y 78.]
- [24] Elena Chamizo Calvo. *Medida de isótopos de Plutonio, ^{239}Pu y ^{240}Pu , mediante espectrometría de masas con aceleradores de baja energía*. PhD thesis, Universidad de Sevilla, 2009. [Citado en las págs. 48, 49 y 78.]

Índice de figuras

1-1. Esquema del ciclo del carbono [5]	4
1-2. Distribución general del carbono en los diferentes reservorios. Esquema obtenido de [5]	5
1-3. Principales fuentes de variación en los cálculos de datación con radiocarbono [5]	8
1-4. Principales fuentes de variación en los cálculos de datación con radiocarbono (antes de extraer la muestra) [7]	12
1-5. Principales fuentes de variación natural en los cálculos de datación con radiocarbono (durante y después la extracción de la muestra) [7]	12
1-6. Principales fuentes de contaminación en involucradas datación con radiocarbono después de su formación [7]	13
1-7. Ejemplo de la repetición de una muestra en LEMA. En rojo se muestran los valores certificados mientras que en negro los medidos.	14
1-8. Variaciones en la tendencia sinusoidal, atribuidas al efecto de Vries.	16
1-9. Versión más reciente (del año 2013) de la curva de calibración para relacionar edades aP con edades radiocarbono.	17
1-10. Edades radiocarbono contra edades calendario del periodo de 9000-11000 ¹⁴ C años aP.	18
1-11. Imagen ilustrativa de la forma de calibración con el programa OxCal (usado en LEMA).	20
2-1. Esquema de la estructura del hueso.	25

2-2. Esquema de la estructura del colágeno	25
2-3. Esquema de la hidroxiapatita en el hueso.	28
4-1. Esquema general del tratamiento para una muestra en LEMA.	35
4-2. Fotografías que ejemplifican el estado inicial de tres muestras de hueso recién llegadas al LEMA.	37
4-3. Esquema resumido sobre la preparación de los huesos	38
4-4. Fotografías del resultado de las primeras etapas de la limpieza de una muestra de hueso.	39
4-5. Fotografías del colágeno UF extraído de una de las muestras en el LEMA.	41
4-6. Analizador Elemental (parte izquierda) y Grafitizador (parte derecha).	41
4-7. Esquema del proceso de grafitización.	42
4-8. Espacio fase en el que son elegidas las partículas buscadas [23].	45
4-9. Esquema básico del acelerador.	46
4-10. Esquema de una lente tipo Einzel.	47
4-11. Esquema de la primera lente electrostática en el sistema.	48
4-12. Esquema del cambio de carga en los aniones dentro del canal de stripping [24]	49
4-13. Esquema del mecanismo Crockoft-Walton para un acelerador tipo Tandem. Finkel y Suter 1993	50
4-14. Esquema de una cámara de Faraday en la que son detectados los isótopos estables.	52
5-1. Gráfica de %N y rendimiento de colágeno UF pertenecientes a los datos listados en el Apéndice B-1	56
5-2. Gráfica de %C y rendimiento de colágeno UF listados en el Apéndice B-2	57
5-3. Gráfica de C/N y rendimiento de colágeno UF. Datos en la tabla B-3	58
5-4. Gráfica comparación entre el factor C/N de algunas muestras LEMA antes y después de la extracción de colágeno UF. Datos en la tabla contenida en el Apéndice C-1.	60

Índice de tablas

2-1. Principales fracciones de hueso usado para análisis por ^{14}C	26
4-1. Clasificación entre los estados de donde provienen las muestras y los tipos de clima de la zona.	34
4-2. Datos de la calibración de los elementos en el cono de extracción.	53
4-3. Datos de la calibración de los elementos en la zona de baja energía.	53
5-1. Comparación de muestras LEMA correspondientes a diferentes fracciones de hueso correspondientes a diferentes fracciones de hueso en las que sí se obtuvo coincidencia entre fechas.	61
5-2. Comparación de muestras LEMA correspondientes a diferentes fracciones de hueso correspondientes a diferentes fracciones de hueso en las que no se obtuvo coincidencia.	62
B-1. Datos sobre el %N correspondientes a la gráfica 5-1	68
B-2. Datos sobre el % C correspondientes a la gráfica 5-2	70
B-3. Datos sobre el cociente C/N correspondientes a la gráfica 5-3	71
C-1. Datos correspondientes a la gráfica 5-4	72