



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE ÁCIDOS GRASOS Y ESTEROLES EN
FRAGMENTOS DE FOGONES OLMECAS Y SU
COMPARACIÓN CON ALIMENTOS DE LA REGIÓN DE
SAN LORENZO VERACRUZ**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

CRISTINA MÁXIMO JIMÉNEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. EN C. LUCÍA CORNEJO BARRERA
VOCAL: M. EN A.I. LANDY IRENE RAMÍREZ BURGOS
SECRETARIO: M. EN C. ROLANDO SALVADOR GARCÍA GÓMEZ
1er. SUPLENTE: DRA. MARISELA BERNAL GONZÁLEZ
2° SUPLENTE: DRA. MARÍA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ DE BAZÚA

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

LABORATORIOS 301, 302 Y 303 DE INGENIERÍA QUÍMICA AMBIENTAL Y DE QUÍMICA AMBIENTAL. CONJUNTO E. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM CON EL USO DE MUESTRAS PROPORCIONADAS POR LA DRA. ANN CYPHERS DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES ANTROPOLÓGICAS, UNAM

ASESOR

DEL TEMA:

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

SUPERVISOR

TÉCNICO:

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SUSTENTANTE:

Cristina Máximo Jiménez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química por ser pilares en nuestras vidas ya que no solo fueron una escuela, también fue una casa

A todas las personas que laboran en los Laboratorios 301, 302 y 303 del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, por su colaboración en este proyecto y por la amabilidad que tuvieron con nosotras

Al Maestro Rolando Salvador García Gómez por su tiempo al realizar las revisiones, por sus sugerencias, por su ayuda técnica y por todo el apoyo brindado

A la Dra. María Carmen Durán Domínguez de Bazúa por su apoyo en las revisiones, por sus correcciones y su interés por esta investigación

A la Dra. Ann Cyphers Tomic del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM, por proporcionarnos las muestras de los fogones, así como por su decidido apoyo para la realización de esta investigación, por proporcionarnos algunos de los reactivos necesarios para la realización de esta investigación, así como su valiosa amistad

A Luis Fernando Hernández Lara por su ayuda en la explicación arqueológica de esta investigación

A la Q. Georgina Duarte Lisci de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química por los análisis realizados y su ayuda en la interpretación de los espectros

Al jurado por su tiempo para las revisiones y sugerencias en la revisión de la tesis

Esta investigación fue financiada parcialmente por el proyecto PAIP (Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado) de la Facultad de Química Clave: 5000-9067, los proyectos PAPIME de la DGAPA-UNAM Claves EN103704, PE 101709 y PE100514 y el proyecto Conacyt Clave: 178656

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Problemática	2
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.2 Objetivos particulares	4
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Los olmecas	5
2.2 San Lorenzo- Tenochtitlan, la primera capital olmeca	6
2.3 Fauna y flora de San Lorenzo	6
2.4 Alimentación olmeca	8
2.5 Los islotes de la llanura norte	8
2.6 Indicadores bioquímicos en la arqueología	9
2.7 Lípidos y restos arqueológicos	10
2.7.1 Ácidos grasos	11
2.7.2 Esteroles	11
2.8 Procesos degradativos y de contaminación en los lípidos	12
2.9 Técnicas analíticas para la determinación de moléculas lipídicas	13
2.9.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)	13
2.9.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución-espectrometría de masas (CLAR-EM)	15
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	17
3.1 Origen de las muestras arqueológicas	17

	Página	
3.2	Metodología del experimento piloto	21
3.2.1	Preparación de la carne de venado y armadillo	21
3.2.2	Proceso de ahumado para la carne de venado y armadillo	22
3.2.3	Homogeneizado de las muestras de carne	22
3.2.4	Liofilización de las muestras de carne	23
3.2.5	Raspado de las ollas de barro previa a la extracción Soxhlet	23
3.2.6	Extracción Soxhlet para las muestras de carne y las ollas de barro	24
3.2.7	Saponificación de las grasas de las ollas de barro y de las muestras de carne de venado y armadillo	25
3.2.8	Derivatización de las muestras de carne de venado y armadillo	26
3.2.9	Extracción de los ésteres metílicos de las muestras de carne de venado y armadillo	27
3.2.10	Extracción de los esteroides de las muestras de las ollas de barro	27
3.2.11	Derivatización de los esteroides de las muestras de las ollas de barro	28
3.2.12	Aislamientos de los esteroides y ácidos grasos en las muestras de ollas de barro y carne de venado y armadillo	28
3.2.13	Determinación de los esteroides y ácidos grasos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) en las muestras de ollas de barro y carne de venado y armadillo	28
3.3	Metodología seguida en las muestras de los fogones	32
3.3.1	Preparación de las muestras arqueológicas para la extracción Soxhlet	32
3.3.2	Extracción Soxhlet para las muestras de los fogones	32
3.3.3	Saponificación del extracto etéreo de las muestras de los fogones	33
3.3.4	Derivatización de las muestras de los fogones para el análisis de ácidos grasos	34
3.3.5	Extracción de los ésteres metílicos de las muestras de los fogones	34
3.3.6	Extracción de los esteroides en las muestras de los fogones	34

	Página	
3.3.7	Derivatización de los esteroides en las muestras de los fogones	35
3.3.8	Aislamientos de los esteroides y ácidos grasos en los fogones	35
3.3.9	Determinación de los esteroides y ácidos grasos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) en las muestras de los fogones	35
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		37
4.1	Resultados de las ollas de barro, la carne de venado y la carne de armadillo en el experimento piloto	37
4.2	Resultados de los ácidos grasos y esteroides presentes en los fragmentos de fogones	46
4.3	Resultados de la obtención de ácidos grasos de las muestras de fogones y su comparación con las carnes de venado y armadillo	51
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		58
5.1	Conclusiones	58
5.2	Recomendaciones	60
ANEXOS		
ANEXO A. CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASAS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS		61
ANEXO B. DIAGRAMAS ECOLÓGICOS		93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		98

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Ácidos grasos en comúnmente encontrados en fragmentos arqueológicos (elaborado con la información de Cañabate-Guerrero y Sánchez-Vizcaíno, 1995)	11
Tabla 2. Cantidad de reactivo a emplear de acuerdo con la masa extraída (Casio-Arreola y Luna-Estrada, 2014)	26
Tabla 3. Datos de la extracción, saponificación y derivatización del material lipídico en la carne de venado y armadillo	39
Tabla 4. Compuestos identificados en las muestras de armadillo (<i>Dasypus novemcinctus</i>) y de venado (<i>Odocoileus virginianus</i>) mediante CG-EM	43
Tabla 5. Datos de la extracción, saponificación y derivatización del material lipídico en las ollas de barro	44
Tabla 6. Esteroles encontrados en las ollas de barro empleadas en el experimento piloto	45
Tabla 7. Datos de la extracción Soxhlet, saponificación y derivatización en los fragmentos de los dos fogones para el análisis de esteroles	48
Tabla 8. Esteroles encontrados en las muestras de los fragmentos de fogón	49
Tabla 9. Datos de la extracción Soxhlet, saponificación y derivatización en los fragmentos de los dos fogones estudiados para el análisis de ésteres metílicos	51
Tabla 10. Resumen de los compuestos determinados en muestras de los dos fogones en estudio, armadillo (<i>Dasypus novemcinctus</i>) y venado (<i>Odocoileus virginianus</i>) por cromatografía e gases/espectrometría de masas, CG-EM	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa de la zona olmeca (Anónimo, 2014)	5
Figura 2. Reconstrucción hipotética de un islote y superestructura con el fogón central que se utilizó para ahumar pescado (Cyphers y col., 2013)	9
Figura 3. Estructuras principales de los esteroles donde R es el grupo funcional característico de cada esterol (Martínez-Martínez, 2002)	12

	Página	
Figura 4.	Sistema de cromatografía de gases-espectrometría de masa (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002)	14
Figura 5.	Componentes básicos de un sistema para CLAR (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002)	16
Figura 6.	Diagrama seguido en el experimento piloto en el análisis de ácidos grasos y colesterol	19
Figura 7.	Diagrama general seguido en el análisis de ácidos grasos y colesterol	20
Figura 8.	Diagrama seguido en las muestras arqueológicas para el análisis de ácidos grasos y colesterol	31
Figura 9.	Esterificación de los ácidos grasos con catálisis ácida (López, 2008)	40
Figura 10.	Trans-Esterificación de lípidos por catálisis ácida (López, 2008)	40
Figura 11.	Rearreglo de McLafferty resultado del ion de masa molecular 74 (López, 2008)	42
Figura 12.	Esquema de fragmentación por IE dando como resultado el [M-31]⁺ (López, 2008)	42
Figura 13.	Autooxidación del colesterol (Boatella y col., 1995)	45
Figura 14	Cromatograma de muestra de la olla con restos de grasas de armadillo	46
Figura 15.	Cromatograma de muestra de la olla con restos de grasas de venado	46
Figura 16	Cromatograma de orilla del fogón 1	49
Figura 17.	Cromatograma del fogón 2	49
Figura 18.	Cromatograma parte trasera del fogón 1	49
Figura 1A.	Cromatograma de la muestra 1 de carne de armadillo	61
Figura 2A.	Cromatograma de la muestra 2 de carne de armadillo	61
Figura 3A.	Cromatograma de la muestra 1 de carne de venado	62
Figura 4A.	Cromatograma de la muestra 2 de carne de venado	62
Figura 5A.	Cromatograma de la muestra 2 de las ollas con exudados de la carne de armadillo	63
Figura 6A.	Cromatograma de la muestra 2 de las ollas con exudados de la carne de venado	63
Figura 7A.	Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FD) para la determinación de ácidos grasos	64
Figura 8A.	Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FD) para la determinación de ácidos grasos	64
Figura 9A.	Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FI) para la determinación de ácidos grasos	65

	Página
Figura 10A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FI) para la determinación de ácidos grasos	65
Figura 11A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FA) para la determinación de ácidos grasos	66
Figura 12A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FA) para la determinación de ácidos grasos	66
Figura 13A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FE) para la determinación de ácidos grasos	67
Figura 14A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FE) para la determinación de ácidos grasos	67
Figura 15A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FD) para la determinación de esteroides	68
Figura 16A. Cromatograma de la muestra 2 fogón 1(FD) para la determinación de esteroides	68
Figura 17A. Cromatograma de la muestra 3 de fogón 1(FD) para la determinación de esteroides	69
Figura 18A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FI) para la determinación de esteroides	69
Figura 19A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FI) para la determinación de esteroides	70
Figura 20A. Cromatograma de la muestra 3 de fogón 1(FI) para la determinación de esteroides	70
Figura 21A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FA) para la determinación de esteroides	71
Figura 22A. Cromatograma de la muestra 2 fogón 1(FA) para la determinación de esteroides	71
Figura 23A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FE) para la determinación de esteroides	72
Figura 24A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FE) para la determinación de esteroides	72
Figura 25A. Cromatograma de la muestra 3 de fogón 1(FE) para la determinación de esteroides	73
Figura 26A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 2 para la determinación de los ácidos grasos	73
Figura 27A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 2 para la determinación de los ácidos grasos	74
Figura 28A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 3 “Centro” para la determinación de los ácidos grasos	74
Figura 29A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 3 “Centro” para la determinación de los ácidos grasos	75
Figura 30A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 3 “Centro” para la determinación de esteroides	75
Figura 31A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 3 “Centro” para la determinación de esteroides	76

	Página
Figura 32A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido heptanoico (Christie, 2015)	76
Figura 33A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido nonanoico (Christie, 2015)	77
Figura 34A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido decanoico (Christie, 2015)	77
Figura 35A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido undecanoico (Christie, 2015)	78
Figura 36A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 9-Dodecanoico	78
Figura 37A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido dodecanoico (Christie, 2015)	79
Figura 38A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido tridecano (Christie, 2015)	79
Figura 39A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 10-metil dodecanoico	80
Figura 40A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 12,13-tetradecadienoico	80
Figura 41A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 9 tetradecanoato	81
Figura 42A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido tetradecanoico(Christie, 2015)	81
Figura 43A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido cis-10 pentadecanoico	82
Figura 44A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido pentadecanoico (Christie, 2015)	82
Figura 45A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 9-hexadecanoico	83
Figura 46A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 11-hexadecanoico	83
Figura 47A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido hexadecanoico (Christie, 2015)	84
Figura 48A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 7 metil-6-hexadecanoico	84
Figura 49A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido heptadecanoico (Christie, 2015)	85
Figura 50A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 9,12-Octadecadienoico	85
Figura 51A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 6,9-octadecadienoico	86
Figura 52A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 9-octadecanoico	86
Figura 53A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 11-octadecanoico	86

	Página
Figura 54A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido octadecanoico (Christie, 2015)	87
Figura 55A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido nonadecanoato (Christie, 2015)	87
Figura 56A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido cis-11-eicosanoico	88
Figura 57A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido eicosanoico (Christie, 2015)	88
Figura 58A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido heneicosanoico (Christie, 2015)	89
Figura 59A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido docosanoico (Christie, 2015)	89
Figura 60A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido tricosanoico (Christie, 2015)	90
Figura 61A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido tetracosanoico (Christie, 2015)	90
Figura 62A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del colesterol (Christie, 2015)	91
Figura 63A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del estigmasterol (Christie, 2015)	91
Figura 67A. Espectro de masas por EI (impacto electrónico, en inglés) del 3,5-colestadien-7-ona	92

ÍNDICE DE IMÁGENES

	Página
Imagen 1. Fragmentos de dos fogones con una antigüedad aproximada de 3000 años: Arriba están dos fracciones de la orilla o pared de un fogón y abajo las del segundo fogón (fondo)	18
Imagen 2. Ahumador provisional compuesto de: a) olla de peltre, b) alambre galvanizado, c) carne de armadillo, d) parrilla, e) rejilla de metal, f) viruta de caoba, g) tapa de peltre, h) carne de venado y i) ollas de barro	22
Imagen 3. Baño refrigerante: a) acetona, b) hielo seco (CO ₂) y c) muestra de carne	22
Imagen 4. Liofilización de las muestras de carne de armadillo y venado	23
Imagen 5. Espectrómetro de masas utilizado en la USAI	30
Imagen 6. Carne de venado (lado izquierdo) y carne de armadillo (lado derecho)	37
Imagen 7. Carnes ahumadas de venado (derecha) y armadillo (izquierda)	38

Imagen 8.	Carnes liofilizadas de venado (derecha) y de armadillo (izquierda)	38
Imagen 9.	Preparación de las muestras de las ollas de barro	38
Imagen 10.	Equipos Soxhlet utilizados para la extracción de grasas	39
Imagen 11.	Caracterización del primer fogón: a) región Fracción Izquierda, b) región Fracción Derecha, c) región Fracción Atrás, d) región Fracción Enfrente (Imagen 1, Fotografía superior izquierda)	47

GLOSARIO

Aluvial	Del lat. <i>alluvies</i> 'aluvión'. Sedimento arrastrado por las lluvias o las corrientes.
Camarón de río	En las aguas dulces del mundo habitan sobre 640 especies de camarones de río. Ellas constituyen un importantísimo nivel trófico. Debido a su actividad omnívora, cumplen en el medio dulce acuático funciones importantes que van desde la limpieza y reciclado de materiales de desecho hasta el control de los niveles microbiológicos de las aguas en los ríos y embalses. En Cuba la especie <i>Samastacus spinifrons</i> (Philippi 1882) se conoce con distintos nombres: Camarón excavador, camarón de río, viejita (litoral norte del municipio Puerto Padre, Las Tunas, Cuba), pití (litoral norte del municipio Puerto Padre, Las Tunas, Cuba) (Ecured, 2015). En México se les conoce con el nombre de origen náhuatl de acociles, de <i>cuitzilli</i> , animal torcido del agua (Cabrera, 2002)
Fitolitos	Biomineralización de origen vegetal. Una biomineralización es la precipitación de un mineral resultante del metabolismo de un organismo vivo
Popal	Palabra de origen náhuatl que significa humedal o ciénega y que por extensión se usa para nombrar a las plantas acuáticas que proliferan en ellos (de <i>potoni</i> heder, (a su vez del latín <i>foetere</i> , verbo intransitivo despedir un olor muy malo y penetrante) y <i>palli</i> , barro. Barros hediendos
u, Da, uma	Unidad de masa atómica. Los espectroscopistas de masas también llaman al uma Dalton y es la unidad estándar a escala atómica o molecular
UGA	Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química de la UNAM
Xoloescuintle	Una especie extinguida de perro pequeño casi sin pelo en el cuerpo, de piel arrugada, color ceniza, manchada de negro (<i>Canis mexicanus</i> ; <i>Canis caribacus</i>). Probable ascendiente del perro chihuahueño. Etimología: perro arrugado, de <i>xolóchtic</i> , arrugado, e <i>ixcuintli</i> , perro. En este vocablo no entra el elemento xólotl, el personaje mitológico o el objeto fusiforme que entra en ajolote, guajolote o tejolote (Cabrera, 2002)

Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

RESUMEN

En esta investigación se estudió el contenido de ácidos grasos y esteroides de tres fragmentos arqueológicos (fogones) provenientes de la región de San Lorenzo-Tenochtitlán, Veracruz, México, en donde se asentó la cultura olmeca. En varias fuentes de la literatura se ha confirmado que los lípidos son los residuos orgánicos que más se han estudiado en vasijas de barro y fogones encontrados, por lo que se consideran de gran utilidad para la interpretación de los datos para determinar posibles contenidos de vasijas. Por ello, en esta parte experimental se extrajeron y analizaron los materiales lipídicos proveniente de muestras biológicas para posteriormente realizar la comparación con las muestras arqueológicas de los fogones proporcionados. Para ello, muestras de carne de armadillo (*Dasypus novemcinctus*) y de venado (*Odocoileus virginianus*) fueron ahumadas para, posteriormente, caracterizar su fracción lipídica. Para la obtención de los ácidos grasos, la grasa extraída fue sometida a una saponificación química seguida de una separación de los triacilglicéridos en ácidos grasos finalizando con una derivatización empleando HCl en metanol para poder transformar los ácidos grasos en sus correspondientes ésteres metílicos. Estos fueron identificados mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Para obtener la fracción de los esteroides, la grasa extraída fue sometida a una saponificación y con la finalidad de separar la fracción no saponificable, se llevó a cabo una extracción mediante disolventes según lo señalado por la normativa vigente en México seguida de su identificación empleando el mismo equipo. Los compuestos de interés fueron identificados con la ayuda del software LECO® ChromaTOF® Optimized for Pegasus 4D. Entre los resultados obtenidos se lograron identificar 2 esteroides en los fragmentos de los fogones: El colesterol y el estigmasterol, indicando la presencia de alimentos de origen animal y de muestras de origen vegetal, respectivamente. Adicionalmente, se identificaron en mayor porcentaje en la carne de venado el ácido esteárico, el ácido oleico y el ácido linoleico, mientras que para el armadillo se encontraron los ácidos palmítico y oleico. Con la finalidad de evaluar si los ácidos grasos en los fragmentos de los fogones eran de origen vegetal o animal se realizó la comparación de las proporciones entre los ácidos palmítico/esteárico. Al llevar a cabo la comparación entre ellos se encontró una proporción de 1.45 para la muestra del fogón denominada 1*, 1.72 para la muestra llamada fogón 1 y de 1.56 para la de fogón 2¹, indicando que los ácidos presentes mayoritariamente eran de origen vegetal, probablemente pertenecientes a la palma o material vegetal utilizado como combustible para el ahumado. Por último, se observó una similitud mayor entre los ésteres metílicos de la carne de armadillo con los restos de los fogones encontrando 17 ésteres metílicos similares entre ambos, los cuales fueron: los ácidos pelargónico, cáprico, tridecanoico, mirístico, 9-metiltetradecanoico, pentadecanoico, palmitoleico, palmítico, margárico, oleico, isómeros del ácido oleico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido tricosenoico y, finalmente, el tetracosanoico. Al comparar con las muestras de venado los ácidos grasos encontrados en común fueron los ácidos tridecanoico, mirístico, 9-metiltetradecanoico, palmítico, margárico, linoleico, oleico, ácido esteárico, araquídico y behénico. Por lo anterior, es recomendable seguir estudiando las muestras de otras partes de fragmentos de fogones con la finalidad de poder corroborar los resultados obtenidos en esta investigación, realizando la comparación con otras muestras biológicas (posiblemente con camarón de río) de la región de San Lorenzo que permita discernir la posible dieta en la que se basaba esta cultura prehispánica.

Palabras clave: Ácidos grasos y esteroides, fragmentos de fogones olmecas, comparación con alimentos actuales de la región, San Lorenzo, Veracruz, México

¹ Se dio la denominación de fogón 1*: Orilla o pared del fogón dividida en 4 regiones, de fogón 1: Orilla del fogón con 1 región y fogón 2: Fondo del fogón

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. PROBLEMÁTICA

En la inundable cuenca baja del río Coatzacoalcos en Veracruz, México, se ubica el centro regional de San Lorenzo. Este complejo arqueológico fue el lugar preciso donde nació la cultura Olmeca, la cual es representativa de una de las antiguas ciudades más sobresalientes de México. Este asentamiento, perteneciente a la cultura Olmeca, se extendió sobre una gran “isla” tropical, delimitada por ríos navegables y grandes llanuras de inundación. Este entorno fue fuente de abundantes recursos alimenticios para su creciente población. Se sabe que su población realizaba actividades como la caza, la pesca, la recolección y la agricultura, por lo que se piensa que la principal forma de preservación de alimentos era el ahumado de animales de la región (Cyphers, 2014).

Como parte del Proyecto Arqueológico San Lorenzo-Tenochtitlán (PASLT) del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM se han llevado excavaciones en la región donde se han encontrado estructuras conocidas como fogones² donde se piensa que preparaban y/o conservaban sus alimentos (Cyphers y col., 2013).

El análisis de los residuos orgánicos en recipientes cerámicos y piezas arqueológicas tiene aplicaciones en el estudio de la alimentación en el pasado, principalmente porque permite entender qué alimentos se producían, conservaban y cocinaban. Dentro de los residuos orgánicos estudiados, se encuentran los lípidos, por ser parte constitutiva de diversos alimentos y por las características químicas que han sido de gran utilidad para la identificación de posibles contenidos en vasijas. Para la realización de estos estudios es esencial considerar que en las paredes de los recipientes

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

cerámicos y de las piezas arqueológicas fueron sometidos a altas temperaturas por lo que los residuos preservados fueron mantenidos durante un tiempo prolongado dentro de los poros y en condiciones normales difíciles de remover o de degradarse químicamente (Barba-Pingarrón y col., 2013).

Dentro del contexto anterior, en esta investigación se analizaron los residuos de lípidos (ácidos grasos y esteroides) de fragmentos de fogones hallados en el sitio arqueológico de San Lorenzo, el cual data del año 900 a.C., con la finalidad de conocer el tipo de alimentación de los habitantes que se tenía en esta región ya que posiblemente entre los alimentos de origen animal que probablemente consumían se encuentre la carne de perro comestible (*xoloizcuintle*, del náhuatl³), tortugas, pescado, venado, armadillo, tapir, jaguar, jabalí, pato silvestre, iguana y faisán, entre otros.

Para poder realizar exitosamente esta investigación los fragmentos de dos fogones fueron proporcionados por personal del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM y, dada la importancia de este estudio, el encontrar indicios de ácidos grasos y colesterol, podría servir de base para un análisis más completo desde el punto de vista arqueológico incrementándose las bases de conocimiento de la cultura Olmeca, en una investigación interdisciplinaria.

Dado lo anterior, este estudio se enfocó en realizar extracciones de los residuos de lípidos de varios fragmentos de un fogón de aproximadamente 3000 años de antigüedad por medio del método de Soxhlet con modificaciones a la norma mexicana NMX-F-89-S-1978 (DOF, 1978) para, posteriormente, realizar las determinaciones de ácidos grasos y esteroides (colesterol para las muestras de origen animal). Para ello se emplearon reactivos menos dañinos con el ambiente que los establecidos por la NMX-F-017-SCFI-2011 (DOF, 2011) para el caso de los ácidos grasos y por la NMX-K-306-SCFI-2006 (DOF, 2006) para el caso de los esteroides.

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

³ Una especie extinguida de perro pequeño casi sin pelo en el cuerpo, de piel arrugada, color ceniza, manchada de negro (*Canis mexicanis*; *Canis caribacus*). El nombre significa perro arrugado de *xolóchtic*, arrugado, e *ixcuintli*, perro (Cabrera, 2002)

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de ácidos grasos y la presencia de esteroides en varios fragmentos de fogones provenientes de la región de San Lorenzo, Veracruz, México, obteniendo datos que sirvan de base para la identificación de alimentos que la población Olmeca consumía.

1.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Extraer ácidos grasos (a partir de los ésteres metílicos) y esteroides (principalmente el colesterol) de los restos de los fogones con aproximadamente 3000 años de antigüedad para su posterior caracterización por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas
- Establecer una metodología para la determinación de esteroides para las muestras arqueológicas siendo analizadas con modificaciones de las normas mexicanas NMX-F-089-S-1978 y NMX-K-306-SCFI-2006
- Obtener los ácidos grasos en muestras biológicas (muestras de venado (*Mazama americana*) y de armadillo (*Dasypus novemcinctus*)) y en muestras arqueológicas (fogones) modificando las normas mexicanas NMX-F-089-S-1978 y NMX-F-017-SCFI-2011
- Comparar los resultados obtenidos de los ácidos grasos y esteroides (colesterol) del fogón con el análisis del contenido de lípidos de 2 especies típicas de la zona: venado y armadillo
- Comparar los resultados obtenidos en el análisis de los ácidos grasos contenidos en el fogón con los criterios de identificación de residuos de alimentos en fragmentos arqueológicos citados en la literatura.

2.2. SAN LORENZO-TENOCHTITLAN, LA PRIMERA CAPITAL OLMECA

Fundado alrededor del 1800 aC, el sitio de San Lorenzo logró su máximo esplendor entre 1400 y 1000 aC. Se extendió sobre una gran “isla” tropical, delimitada por ríos navegables y grandes llanuras de inundación en la cuenca baja del río Coatzacoalcos (Cyphers, 2014). San Lorenzo fue la cabecera de las aldeas dispersas que pagaban tributo al centro político ya que éste dominaba el tránsito fluvial y los cultos religiosos. Esta capital estaba compuesta por grupos de campesinos, artesanos, comerciantes, chamanes, guerreros y jefes políticos que se transmitían sus oficios y posiciones de manera hereditaria (Florescano, 2007).

Este entorno natural posee las características necesarias para actividades como la pesca, cacería y agricultura. Así, esta área es fuente de abundantes recursos alimenticios. Sin embargo, por las mismas características del entorno, hay dos hechos de suma importancia para esta región así como para el estudio de la capital Olmeca. El primero de ellos es la canícula, un tiempo caracterizado por una disminución de precipitación y altas temperaturas. El segundo es la inundación grande anual. Estos dos episodios fueron de suma importancia para los pobladores de San Lorenzo (Cyphers y col., 2013).

2.3. FLORA Y FAUNA DE SAN LORENZO

La temperatura promedio de esta región generalmente es de 22°C, mientras que la más baja es de 18°C en épocas de frío. Las lluvias son de mayo a noviembre con una precipitación anual que va de los 2000 mm a los 3500 mm provocando inundaciones provenientes del río Coatzacoalcos y sus afluentes (Arieta-Baizabal, 2013). Debido a estas características, la zona tiene diversos ambientes en diferentes épocas de año. En la actualidad, el tipo de vegetación que corresponde a San Lorenzo es el de la selva perennifolia, siendo algunas de las especies más importantes: *Terminalia amazonia* (sombrerete), *Vochysia hondurensis* (palo de agua), *Andira galeottiana* (macaya), *Sweetia panamensis* (chakte), *Cedrela odorata* (cedro rojo), *Swietenia macrophylla* (caoba), *Gualtteria anómala* (Zopo), *Pterocarpus*

hayessi (chabekte'), *Brosimum alicastrum* (ramón), *Ficus* sp. (matapalo), *Dialium guianense* (guapaque), bari, guayabo volador, zapote de agua (Arieta-Baizabal, 2013).

Se cree que este tipo de vegetación también estaba presente en el tiempo de los Olmecas, pero en algunos estudios que se han realizados en fitolitos, se ha planteado también la existencia de un tipo de vegetación que prolifera en las zonas llamadas popal en náhuatl⁴ (Symonds y col., 2002). La vegetación acuática que crece en esas aguas pantanosas o de agua dulce estancada recibe también el nombre de popal. Los principales representantes de este tipo de vegetación son *Thalia geniculata* (conocida como popal camalote), *Calathea* y *Heliconia* (INECC, 2015).

Como en la mayoría de las regiones del mundo, existe una gran cantidad de animales. En el caso de San Lorenzo, los reptiles son los que presentan un mayor porcentaje de la fauna, por mencionar algunos: diversos tipos de tortuga (blanca, pinta, galápago, pochitoca, sabanera), iguanas, serpientes (nauyaca, coralillo, rabohueso, la voladora, la tatuana y la mano de metate) e iguanas (Arieta-Baizabal, 2009), que son utilizados en algunas regiones de Veracruz para el consumo humano.

Otro grupo importante de la fauna son los mamíferos como: jaguar, venado, tapir, ardilla, tejón, mapache, zorrillo, gato montés, coyote, nutria, tigre real, tlacuache, chango, conejo y rata o ratón de campo (Arieta-Baizabal, 2009). De este grupo, el venado se utiliza todavía en platillos típicos de la región.

Al encontrarse en una zona de inundaciones los peces son de suma importancia en la alimentación de los pobladores de la región. Entre las especies más abundantes se encuentra: el sábalo, robalo, peje lagarto, bocachica, mojarra, pámpano, banderilla, lisa y camarón de río (Arieta-Baizabal, 2009).

⁴ Popal, palabra de origen náhuatl, que denomina a los humedales o ciénegas, de *potoni* heder (Del latín *foetēre*. Verbo despedir un olor muy malo y penetrante) y *palli*, barro. Barros hediendos

2.4. ALIMENTACIÓN OLMECA

La dieta de las culturas mesoamericanas era variable. Sembraban y consumían maíz, aunque este quizá no era su principal recurso por las características fisiográficas de la región de Coatzacoalcos. En algunas investigaciones recientes se ha visto que una bebida elaborada con cacao y algunos tubérculos (como: la yuca, el ñame y la malanga) eran muy utilizados en su dieta como fuente de hidratos de carbono o carbohidratos (Cyphers, 2014).

Los Olmecas también se dedicaban a la caza. Mucha de la fauna que persistía en la región era cazada y probablemente consumida. Se piensa que al ser una zona de inundaciones, la mayor parte de sus recursos alimentarios provenían de este entorno acuático, como son: pescados, tortugas y camarón de río principalmente (Cyphers y col., 2013).

Otras especies que ya no se encuentran en la actualidad pero que se consumían eran el armadillo, el pecarí y el xoloitzcuintle (una raza de perro sin pelo, como ya se mencionó), que eran consumidas en las largas festividades que se llevaban a largo del año.

Todavía en la actualidad la población de la zona de Coatzacoalcos prepara alimentos donde se destacan ingredientes como la carne de venado, el pescado, la tortuga por mencionar solamente algunos (Arias-Rodríguez, 1999).

2.5. LOS ISLOTES DE LA LLANURA NORTE

Como característica importante de San Lorenzo se encuentran construcciones artificiales localizadas en los humedales llamadas islotes. Los islotes⁵ que se encuentran en la llanura norte de San Lorenzo son construcciones artificiales cuyo promedio de tamaño es de 1.3 m de alto y de 50 m de diámetro con 170 m³ de rellenos. Dentro de estas estructuras había un elemento recurrente al cual se le conoce como fogón. Este elemento a veces se encontraba ubicado en el centro de la estructura. Su tamaño varía de 50 a 190 cm de largo con un ancho de 30 y 60 cm (Cyphers y col., 2013). Entre los diferentes usos que se cree que

⁵ Islote: Isla pequeña y despoblada (RAE, 2014).

tuvieron los fogones está el de la preparación de alimentos ahumados y secos, ya que se han encontrado dos restos de importancia. El primero son los restos de un elemento quemado utilizado como combustible. Mientras que el segundo es la presencia de espículas de esponjas de agua dulce y salada, debido a las inundaciones y a la limpieza que se llevaba a cabo en los fogones (Cyphers, 2014). En la Figura 2 se muestra una reconstrucción de un islote y la estructura de un fogón.

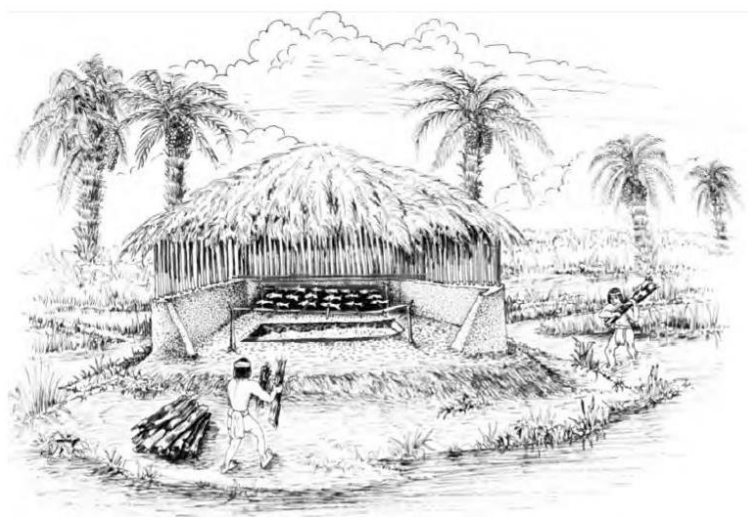


Figura 2. Reconstrucción hipotética de un islote y superestructura con el fogón central que se utilizó para ahumar pescado (Cyphers y col., 2013)

2.6. INDICADORES BIOQUÍMICOS EN LA ARQUEOLOGÍA

En años recientes, el análisis de biomarcadores⁶ (impregnados en los poros de pisos y cerámica ha sido un instrumento importante para el conocimiento de las actividades humanas. Este tipo de investigación se basa en el hecho de que los líquidos empleados o producidos por las diferentes actividades, al caer al piso, son absorbidos y protegidos en el interior de los poros de los materiales sobre los que caen y quedan preservados de tal forma que pueden ser analizados mucho tiempo después del momento de su depósito (Barba-Pingarrón y col., 2013).

⁶ Biomarcadores o indicadores bioquímicos son aquellas sustancias que se producen en los residuos orgánicos que proporcionan información sobre las actividades humanas en el pasado (Evershed, 2008)

La aplicación del análisis de los biomarcadores, requiere no sólo conocimiento de las composiciones de las materias primas orgánicas explotadas por los seres humanos en el pasado, sino también una apreciación de cómo estos materiales pueden ser alterados por el procesamiento y/o entierro. Entre los biomarcadores más utilizados para la determinación de alimentos consumidos en el pasado, se encuentran los lípidos como los ácidos grasos y el colesterol (Evershed, 2008).

2.7. LÍPIDOS Y RESTOS ARQUEOLÓGICOS

Los lípidos se encuentran en una gran cantidad de alimentos tanto de origen animal como vegetal. Por sus características fisicoquímicas son utilizados como biomarcadores en la arqueología. Entre las fracciones con mayor importancia en este campo están: los ácidos grasos, acilglicérols y esteroides. Una de las características de los lípidos es la conservación de estos en cerámica, pisos y áreas de preparación de alimentos. El grado de conservación de los restos de materia orgánica depende de tres factores.

- I. Las condiciones de enterramiento. Condiciones iguales a lo largo del período de enterramiento favorecen la conservación. Esta condición dependerá de la región en donde sucedió la actividad humana.
- II. El material cerámico. Debido a las características de la matriz arcillosa de las cerámicas los lípidos quedan atrapados en ella, permaneciendo protegidos de agresiones degradativas externas como son los microorganismos, luz, oxígeno, por mencionar solamente algunos.
- III. Carbonización. Cuando los tejidos orgánicos se carbonizan a baja temperatura, la actividad de cualquier microorganismo presente en esos tejidos disminuye y las superficies externas se fusionan proporcionando una barrera carbonizada contra el ataque microbiano (Cañabate-Guerrero y Sánchez-Vizcaíno, 1995).

Otra característica de los lípidos es ser solubles en solventes orgánicos y de ser casi insolubles en agua, lo que hace posible que sean separados de otras biomoléculas por extracción con solventes como el cloroformo y el metanol.

2.7.1. ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos con el glicerol forman estructuras llamadas triacilgliceroles, que son los lípidos más abundantes en los alimentos. Por ser solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua y tener una composición específica en animales y vegetales son uno de los grupos de compuestos de mayor estudio en la arqueología.

La mayoría son ácidos carboxílicos de cadena alifática con número par de átomos de carbono. Estos pueden ser saturados o insaturados (Baduí-Dergal, 2006). Dependiendo del origen, ya sea animal o vegetal, el perfil lipídico será diferente.

En la Tabla 1 se mencionan algunos ácidos grasos comúnmente encontrados en restos de fragmentos arqueológicos.

Tabla 1. Ácidos grasos comúnmente encontrados en fragmentos arqueológicos (elaborado con la información de Cañabate-Guerrero y Sánchez-Vizcaíno, 1995)

Ácidos grasos saturados	Ácidos grasos insaturados
C14:0 ácido mirístico	C16:1 ácido palmitoleico
C16:0 ácido palmítico	C18:1 ácido oleico
C18:0 ácido esteárico	
C20:0 ácido araquidónico	

2.7.2. ESTEROLES

Los esteroides son los componentes de la fracción no saponificable de los lípidos. Los esteroides están ampliamente distribuidos en los animales, siendo el compuesto principal el colesterol. Esta molécula es un constituyente importante de membranas y precursor de

sustancias fisiológicamente importantes como son las hormonas, los ácidos biliares y las vitaminas D y E. En las plantas se encuentran principalmente los denominados fitoesteroles, como: sitosterol, campesterol y estigmasterol. Algunas estructuras se muestran en la Figura 3.

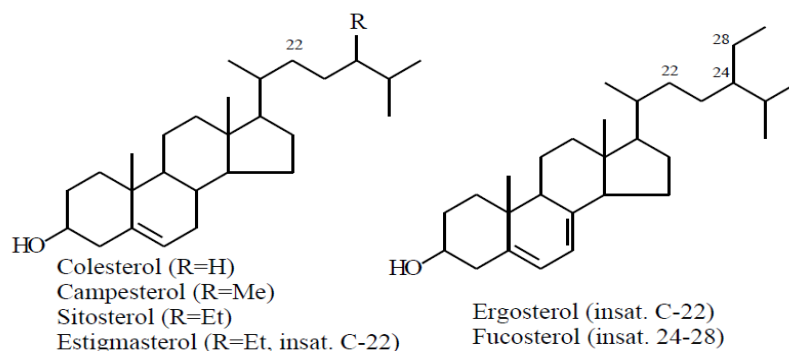


Figura 3. Estructuras principales de los esteroides donde R es el grupo funcional característico de cada esteroide, donde Me=Metanol, Et=Etanol (Martínez-Martínez, 2002)

Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de los esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un doble enlace en el C-5 (Martínez-Martínez, 2002).

El colesterol es un esteroide de gran importancia para los mamíferos presentándose ya sea libre o esterificado con ácidos grasos saturados y no saturados en la fracción lipídica (Belitz, 1988).

2.8. PROCESOS DEGRADATIVOS Y DE CONTAMINACIÓN EN LOS LÍPIDOS

Los lípidos al ser moléculas orgánicas pueden sufrir diversos procesos de degradación o de contaminación, dependiendo de las condiciones externas en que estos se encuentren. Estos diversos procesos se deben tener en cuenta en la interpretación de los datos. Los principales procesos son los siguientes:

- *Hidrólisis:* Este proceso, provocado por humedad, temperatura, enzimas y diversos microorganismos, producen la ruptura del enlace éster, dando lugar a la liberación

de los ácidos grasos que forman parte de los acilglicérols, produciendo una alteración de las proporciones relativas de estas dos moléculas.

- *Oxidación*: los lípidos son sensibles a la oxidación por sus características químicas, en especial los ácidos grasos insaturados, ya que genera compuestos diferentes dependiendo de la cantidad de insaturaciones.
- *Microbiológica*: La materia orgánica enterrada está protegida de alguna forma, pero puede llegar a sufrir procesos degradativos por microorganismos, en condiciones aerobias y por condiciones físicas del enterramiento.
- *Contaminación lipídica post- excavación*: Este tipo de contaminación, no tiene un origen biológico, surge del almacenamiento de las muestras en plástico. Las sustancias contaminantes procedentes de este tipo de almacenamiento son los ftalatos (Cañabate-Guerrero y Sánchez-Vizcaíno, 1995).

2.9. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE MOLÉCULAS LIPÍDICAS

2.9.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

El uso de técnicas analíticas para el análisis de piezas arqueológicas, se ha llevado a cabo recientemente. Estos análisis cada vez han sido más completos. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM, por sus siglas en español o *GC-MS*, por sus siglas en inglés) es una técnica muy completa que logra la detección de moléculas orgánicas como son los ácidos grasos y los esteroides y, de este último, especialmente el colesterol. En la Figura 4 se ilustra un sistema de CG-EM.

La cromatografía es un método utilizado para la separación de los componentes de una muestra en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es la fase móvil (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002). En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas, donde se lleva a cabo una separación con respecto a la polaridad entre las fases. Un cromatógrafo de gases consta básicamente de: una fuente de gas portador, un sistema para la introducción de las

muestras, una columna cromatográfica, un detector y un sistema para el tratamiento de los datos (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002). Esta técnica es muy utilizada para la separación de compuestos como: aceites esenciales, ácidos grasos, y algunos agentes contaminantes en agua y en suelos.

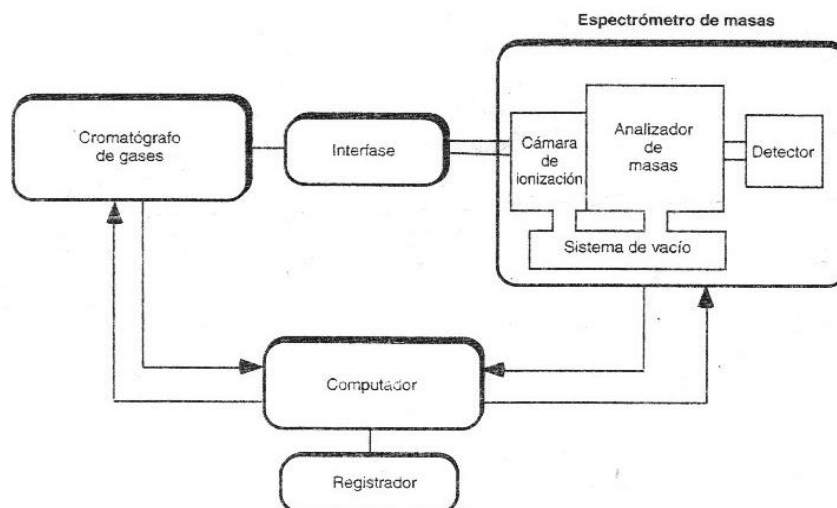


Figura 4. Sistema de cromatografía de gases-espectrometría de masa (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002)

La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente masa. Comprende básicamente cuatro etapas, las cuales se citan a continuación: Ionización de la muestra, aceleración de los iones por un campo eléctrico, dispersión de los iones según su relación masa/carga, la detección de los iones generados y, finalmente, la producción de la correspondiente señal eléctrica (Cañada, 2011).

Como consecuencia del bombardeo electrónico en la cámara de ionización, las moléculas se rompen en una serie de fragmentos. Siempre que una misma molécula se rompa en las mismas condiciones da el mismo tipo y número de fragmentos que constituyen la fragmentación patrón. Gracias a esto se puede determinar una muestra por comparación y, por otra parte, la intensidad relativa de los distintos picos permite deducir la proporción en que cada componente se encuentra en la muestra. El pico del espectrograma que aparece con valor más elevado de la relación masa carga (m/e) corresponde a la molécula ionizada sin fragmentar y recibe el nombre de masa patrón. Esta masa patrón permite determinar con

rapidez y precisión la masa molecular, siempre que se opere con una tensión de ionización no excesivamente elevada, la cual produciría la fragmentación total de la molécula (Rouessac y Rouessac, 2003).

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. La asociación de las dos técnicas, *GC* (*Gas Chromatography*, por sus siglas en inglés) y *MS* (*Mass Spectrometry*, por sus siglas en inglés) da lugar a una técnica combinada *GC-MS* que permite la separación e identificación de mezclas complejas (Cañada, 2011).

Los ácidos grasos y otras fracciones de los lípidos, como la de los esteroides son moléculas que comúnmente son analizadas por este par de técnicas analíticas. Los ácidos grasos son comúnmente analizados en su forma como derivados de ésteres de metilo mientras que los esteroides son analizados con más frecuencia como TMS (derivados de éter) o compuestos libres (Ciliberto y Spoto, 2000).

2.9.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CLAR-EM)

La utilidad de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (*HPLC-EM*, por sus siglas en inglés o *CLAR-MS* por sus siglas en español) radica en su capacidad para analizar mezclas de componentes que son demasiado volátiles o térmicamente inestable para ser analizadas por *CG/EM*. En el caso de los lípidos esta combinación de técnicas es muy poco usada.

De igual forma que la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos es una técnica para la separación de componentes en mezclas, con la diferencia que la fase móvil en esta técnica es un líquido.

La cromatografía líquida es muy similar a la cromatografía de gases y las diferencias entre técnicas, se citan a continuación. La interacción entre las moléculas de los gases, a diferencia de los líquidos, suele ser pequeña; los gases se difunden entre sí mucho mejor que los líquidos; las propiedades superficiales de los líquidos también influyen sobre sus características cromatográficas; la mayor densidad de los líquidos con respecto de la de los gases permite usar la gravedad o la fuerza centrífuga como fuerza motriz de la fase móvil (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002). La cromatografía líquida es utilizada para la separación de compuestos que no son lo suficientemente volátiles para poder ser separados e identificados en la técnica de cromatografía de gases.

Los componentes básicos de un sistema para CLAR se mencionan a continuación: depósito para la fase móvil, sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil, depósito para la introducción de la muestra, columna cromatográfica, detector y sistema para el tratamiento de datos (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002). En la Figura 5 se muestra un diagrama de un sistema para CLAR.

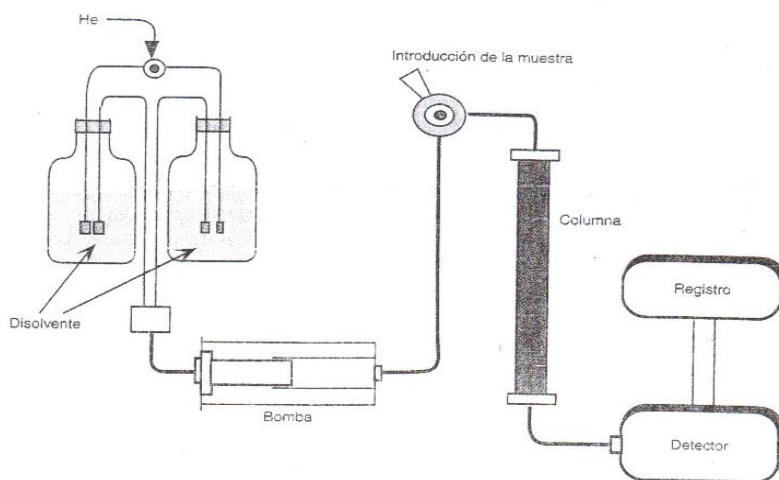


Figura 5. Componentes básicos de un sistema para CLAR (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002)

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS ARQUEOLÓGICAS

Como parte del Proyecto Arqueológico San Lorenzo-Tenochtitlan (PASLT) del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM, se han llevado excavaciones donde se han encontrado restos de diferentes fogones. Las piezas arqueológicas utilizadas en este trabajo, fueron encontradas en una excavación en el año de 1998, en una planicie aluvial en el centro regional de San Lorenzo, Veracruz, pertenecientes a las paredes y fondo de dos fogones diferentes. En la Imagen 1 se aprecian en la parte superior izquierda y derecha las muestras arqueológicas de las paredes de uno de los fogones, mientras que en la parte inferior central se aprecia la parte del fondo de otro de los fogones. Estas piezas arqueológicas fueron proporcionadas por personal del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM y las piezas cuentan con aproximadamente 3000 años de antigüedad.

Previo a la determinación de ácidos grasos y de colesterol en las muestras arqueológicas de estos dos fogones, se realizó un experimento piloto con la finalidad de familiarizarse con la técnica de extracción y cuantificación de ácidos grasos. El experimento consistió en un ahumado artesanal, con ollas de barro conseguidas en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México. El empleo de ollas de barro fue con la finalidad de recrear las condiciones en que los Olmecas preparaban sus alimentos, por lo que se eligieron muestras de carne de venado y de armadillo por ser alimentos consumidos o que existieron en la región de Coatzacoalcos, Veracruz, México.

En la Figura 6 se aprecia un diagrama del experimento piloto, tanto para ácidos grasos como para colesterol.

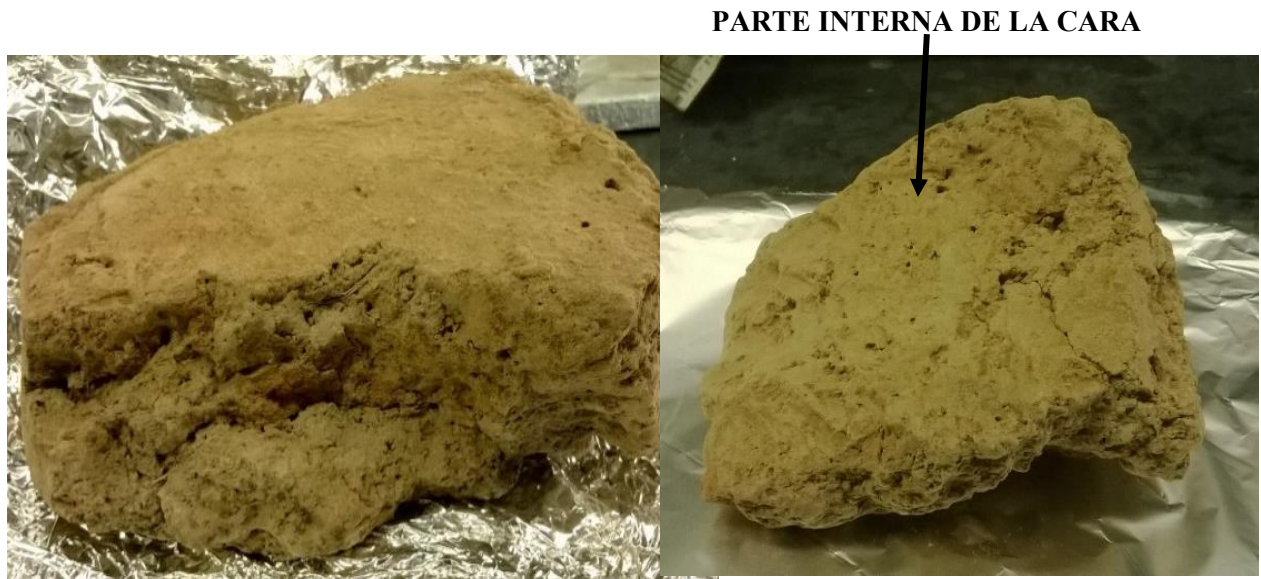


Imagen 1. Fragmentos de dos fogones con una antigüedad aproximada de hace 3000 años: Arriba están dos fracciones de la orilla o pared de un fogón y abajo las del segundo fogón (fondo)

En la Figura 7 se muestra el diagrama general de toda la metodología utilizada en el estudio. Cabe destacar que las muestras analizadas se realizaron por triplicado para el caso de los ácidos grasos (carne de venado y armadillo) y por duplicado para los análisis de esteroides (ollas de barro).

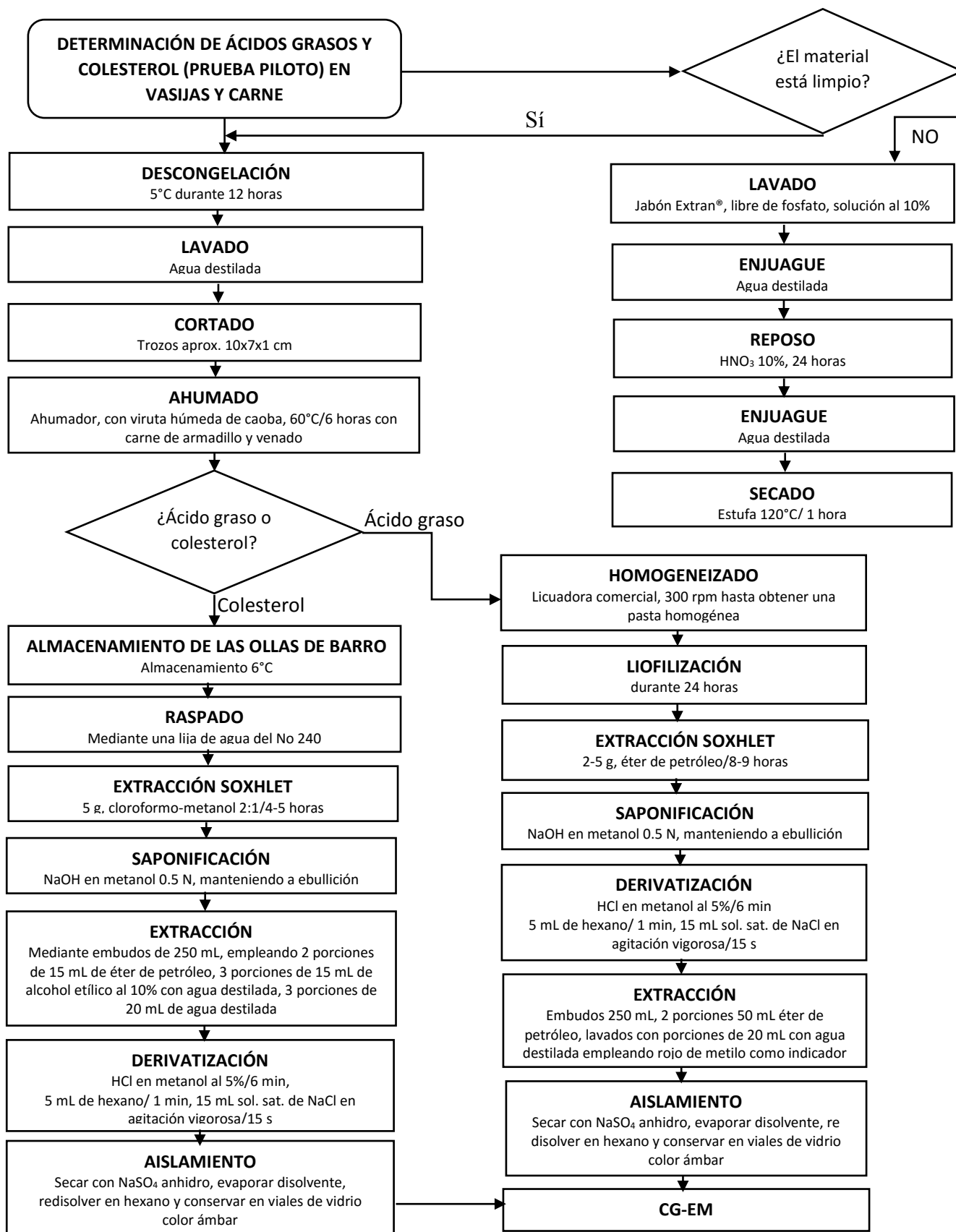


Figura 6. Diagrama seguido en el experimento piloto en el análisis de ácidos grasos y colesterol

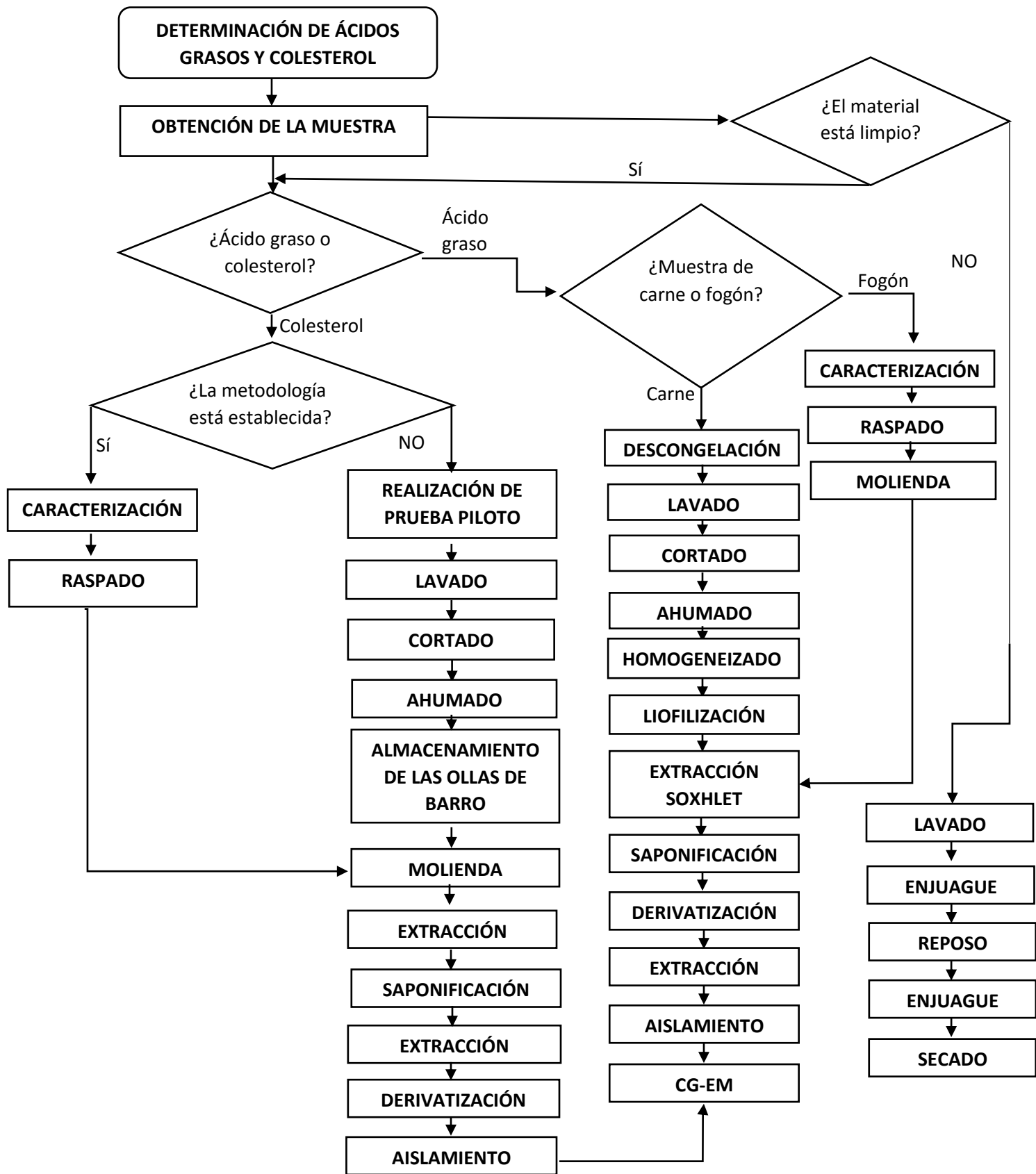


Figura 7. Diagrama general seguido en el análisis de ácidos grasos y colesterol

3.2. METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO PILOTO

3.2.1. PREPARACIÓN DE LA CARNE DE VENADO Y ARMADILLO

Las carnes a evaluar: carne de venado (*Mazama americana*) y de armadillo (*Dasypus novemcinctus*), fueron conseguidas en el Mercado de San Juan, de la Ciudad de México. Una vez adquiridas se dejaron descongelar a 6°C durante 12 horas para, posteriormente, proceder a su lavado con agua destilada dejándose escurrir hasta que quedaran secas.

Se procedió a cortar la carne en trozos de aproximadamente 10x2x1 cm. Una vez cortados se atravesaron con un alambre galvanizado para proceder a su ahumado.

3.2.2. PROCESO DE AHUMADO PARA LA CARNE DE VENADO Y DE ARMADILLO

Para el proceso de ahumado se desarrolló un ahumador provisional que se aprecia en la Imagen 2, para lo cual, se colocó el alambre galvanizado con la carne a lo largo del diámetro de la olla.

Posteriormente, se pusieron debajo de la carne vasijas de barro sin barnizar, conseguidas en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México, con la finalidad de coleccionar los exudados de la carne que se lixivian durante el proceso de ahumado.

Para realizar el ahumado se utilizó viruta de caoba humedecida, con la finalidad de favorecer la generación de humo y evitar que éstas se quemaran. Se prosiguió a ajustar la temperatura de la parrilla a 350°C, logrando una temperatura interior del ahumador de 60°C, el tiempo de ahumado fue de 6 horas.

Una vez transcurrido el tiempo del ahumado, se dejó enfriar la carne y las vasijas a temperatura ambiente y se prosiguió a guardar en refrigeración a una temperatura de 6°C para su próxima utilización.



Imagen 2. Ahumador provisional compuesto de: a) olla de peltre, b) alambre galvanizado, c) carne de armadillo, d) parrilla, e) rejilla de metal, f) viruta de caoba, g) tapa de peltre, h) carne de venado y i) ollas de barro

3.2.3. HOMOGENEIZADO DE LAS MUESTRAS DE CARNE

Una vez ahumadas y enfriadas a temperatura ambiente las muestras de venado y armadillo, se pesaron y se molieron a 300 rpm con ayuda de una licuadora comercial, para colocarse en recipientes de plástico blanco con tapa, con capacidad de 500 mL para proceder a su congelamiento con ayuda de una mezcla de acetona con hielo seco (CO_2) para generar un baño refrigerante y congelarlas a -70°C como se muestra en la Imagen 3.

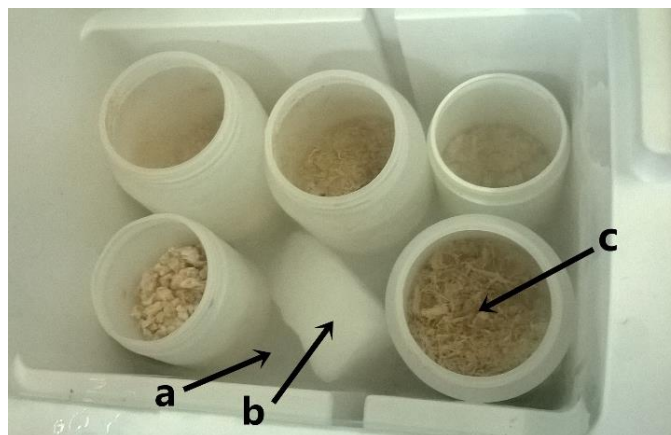


Imagen 3. Baño refrigerante. a) acetona, b) hielo seco (CO_2) y c) muestra de carne

3.2.4. LIOFILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CARNE

Una vez congeladas las muestras se llevó a cabo su liofilización en una liofilizadora marca LABCONCO, modelo Free Zone 4.5 (Imagen 4), durante 24 horas, a una presión de: 13×10^{-3} milibar y una $T = -50^{\circ}\text{C}$. Las muestras fueron liofilizadas debido a que los lípidos no pueden ser extraídos en alimentos húmedos y la penetración del solvente en los tejidos se dificulta. Una ventaja de la liofilización de la muestra es la conservación de la muestra por un periodo mayor que si solamente es ahumada la muestra. Este proceso es utilizado como un método de secado que no requiere de altas temperaturas. Otros tipos de métodos de secado pueden afectar tanto al tejido como provocar en los lípidos reacciones de oxidación no deseables.



Imagen 4. Liofilización de las muestras de carne de armadillo y venado

3.2.5. RASPADO DE LAS OLLAS DE BARRO PREVIA EXTRACCIÓN SOXHLET

Este paso se realizó usando una lija de agua del No.240. Para ello se raspó el interior de las ollas de barro sin barniz, la cual tenía depositados los exudados de la carne de venado o de armadillo. Al término del proceso de calentamiento de las ollas se fragmentaron con ayuda de un martillo para que fuera más fácil el raspado en el interior de las ollas. Posteriormente, se prosiguió a raspar el interior, obteniendo un polvo fino con la reducción de partícula necesaria para llevar a cabo la extracción Soxhlet.

3.2.6. EXTRACCIÓN SOXHLET PARA LAS MUESTRAS DE CARNE Y LAS OLLAS DE BARRO

Los lípidos se encuentran clasificados en ácidos grasos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, ceras, terpenos y esteroides. Los ácidos grasos forman la parte mayoritaria de los lípidos, con la propiedad de ser moléculas bipolares, lo que permite que sean solubles en disolventes orgánicos y poco solubles en agua. Estas moléculas son muy buenos indicadores por todas las características mencionadas, además de que el análisis de ácidos grasos es relativamente barato y rápido en comparación con otros tipos. En el caso de los esteroides, éstos son lípidos no saponificables solubles en disolventes orgánicos y son poco solubles en agua. Los esteroides no son moléculas mayoritarias de los lípidos, sin embargo, tienen la particularidad de ser un buen indicador en la arqueología, ya que en la fracción de los esteroides está presente la molécula del colesterol. El colesterol es un componente mayoritario de las membranas plasmáticas de los animales. En esta investigación se realizaron extracciones del material lipídico mediante el método Soxhlet que se describe a continuación.

Para los dos tipos de muestras se realizaron extracciones Soxhlet, cada una de ellas por triplicado, colocándose 3 matraces bola de fondo plano previamente lavados y a masa constante con perlas de ebullición en una estufa a 120°C por 1 hora. Se pesaron de 3 a 5 g de muestra, sobre un papel filtro, se enrolló el papel y se colocó en un cartucho de celulosa, se prosiguió a tapar el cartucho con algodón (evitando que tocara la muestra) y colocándolo en el extractor Soxhlet. Se conectó el matraz al extractor, donde se encontraba el cartucho y se conectó al refrigerante. Posteriormente, se agregó la cantidad de disolvente suficiente (ya que los extractores no eran del mismo volumen). Para el caso de las muestras de carne el disolvente utilizado fue éter de petróleo, mientras que para las muestras de las ollas de barro se utilizó una mezcla de cloroformo:metanol 2:1(v/v) (Cañabate-Guerrero y Sánchez-Vízcaíno, 1995). Se calentaron y se mantuvieron a ebullición moderada en parrillas de calentamiento. El tiempo de extracción de la grasa dependió de la naturaleza de las muestras. Para las muestras de carne el tiempo requerido fue de 6 horas mientras que para

las muestras provenientes de las ollas de barro se tuvieron durante 4 horas. Para verificar la extracción total de la grasa de la muestra, se dejó caer una gota de disolvente y, si después de dejar evaporar el disolvente, no se lograban observar restos de grasa en el papel filtro, la extracción se daba por concluida. Una vez terminada la extracción, se retiró el refrigerante y el extractor junto con la muestra desengrasada, tratando de recuperar la mayor cantidad de disolvente. El disolvente que se logró recuperar se guardó para un siguiente tratamiento. Con el objetivo de concentrar la muestra se prosiguió el calentamiento leve del matraz en una campana de extracción hasta que el disolvente que contenía el matraz con la muestra evaporada. Finalmente, el matraz se dejó enfriar en una campana de extracción para poder calcular el porcentaje de grasa mediante la siguiente fórmula química:

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{P - p}{M}$$

donde:

P= Masa en gramos del matraz con grasa

p= Masa en gramos del matraz sin grasa a masa constante

M= Masa en gramos de la muestra

3.2.7. SAPONIFICACIÓN DE LAS GRASAS DE LAS OLLAS DE BARRO Y DE LAS MUESTRAS DE CARNE DE VENADO Y ARMADILLO

Para el análisis de los ácidos grasos y los esteroides se debe realizar una saponificación. El objetivo de este procedimiento es diferente para los ácidos grasos y para los esteroides. En el caso de los ácidos grasos, la saponificación se realiza para la obtención de los ésteres metílicos. En el caso de los esteroides se busca una separación de la fracción no saponificable a la que pertenecen los esteroides. La metodología utilizada para la saponificación de las muestras fue obtenida de las normas NMX-K-306-SCFI-2006 (DOF, 2006) y NMX-F-017-SCFI-2011 (DOF, 2011), con algunas modificaciones realizadas a lo largo del montaje, propuestas por Casio-Arreola y Luna Estrada (2014). Estas modificaciones se realizaron con la finalidad de emplear reactivos más amigables con el ambiente. Para realizar la saponificación de la muestra se agregó NaOH 0.5 N en metanol a

la grasa contenida en el matraz de bola, de acuerdo con las cantidades establecidas en la Tabla 2. El matraz se conectó a un condensador y se calentó la mezcla en una parrilla de calentamiento hasta que los glóbulos de grasa formaran una sola fase con la solución acuosa de NaOH.

Tabla 2. Cantidad de reactivo a emplear de acuerdo con la masa extraída (Casio-Arreola y Luna-Estrada, 2014)

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

3.2.8. DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CARNE DE VENADO Y DE ARMADILLO

Para las muestras de carne de venado y de armadillo se prosiguió a realizar una derivatización, por lo que se agregó HCl al 5% en metanol, en vez de trifluoruro de boro que es el que recomienda utilizar la NMX-F-017-SCFI-2011 (DOF, 2011), a través del condensador, de acuerdo con las cantidades que aparecen en la Tabla 2 y lo recomendado por Casio-Arreola y Luna-Estrada (2014). La mezcla fue mantenida en ebullición durante 6 min. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 5 mL de hexano a través del condensador y se mantuvo a ebullición por 1 minuto más. Pasado este tiempo se desconectó el condensador y se retiró el matraz de la parrilla de calentamiento. Inmediatamente se agregaron 15 mL de solución acuosa saturada de cloruro de sodio (NaCl), se tapó el matraz y se agitó vigorosamente durante 15 s mientras la mezcla se encontraba aún tibia. Finalmente, se dejó reposar la mezcla un par de minutos para que la solución de hexano con los ésteres metílicos flotara en el cuello del matraz.

3.2.9. EXTRACCIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LAS MUESTRAS DE CARNE DE VENADO Y ARMADILLO

Para poder analizar y caracterizar los ésteres metílicos en el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas, fue necesario realizar una separación de las fases de la mezcla obtenida después de la derivatización (muestras de ésteres metílicos, solución de sal y de hexano). Para ello, se transfirió la mezcla del matraz a un embudo de separación de 250 mL, en donde se realizaron 2 extracciones líquido-líquido cada una con porciones de 50 mL de éter de petróleo (reutilizando el éter de petróleo recuperado de las extracciones de grasa de la carne de venado y armadillo). Los extractos etéreos fueron lavados con porciones de 20 mL de agua destilada hasta que estuvieran libres de ácido comprobando esto con indicador rojo de metilo.

3.2.10. EXTRACCIÓN DE LOS ESTEROLES DE LAS MUESTRAS DE LAS OLLAS DE BARRO

En la fracción saponificable extraída se encuentran decenas de compuestos orgánicos lo que puede dificultar el análisis de los compuestos de interés (principalmente colesterol), si se encuentran en concentraciones relativamente bajas. Debido a esto se realizaron varias extracciones líquido-líquido. La metodología que se utilizó para realizar la separación de la fracción no saponificable fue obtenida de la NMX-K-306-SCFI-2006 (DOF, 2006), con algunas modificaciones para el análisis y posterior caracterización de los esteroides. Una vez terminada la saponificación del extracto etéreo, se realizó una separación de la fracción no saponificable. Se desconectó el refrigerante y se retiró el matraz de la parrilla de calentamiento. El contenido del matraz se transfirió a un embudo de separación de 500 mL, donde se realizaron lavados. Antes de empezar los lavados se lavó el matraz con una porción de 15 mL de alcohol etílico al 95%, el segundo lavado fue con una porción de 15 mL de agua tibia y finalmente con una porción de 15 mL de agua fría. Se transfirieron los lavados del matraz al embudo de 500 mL y se realizó un lavado con una porción de 20 mL de éter de petróleo reutilizando el éter de petróleo, recuperado de las extracciones de grasa de la carne de venado y armadillo. Se juntó la fracción del lavado anterior y se transfirió

nuevamente al embudo de separación de 500 mL. Se prosiguió a realizar dos extracciones con porciones de 15 mL de éter de petróleo. Se juntaron las fracciones etéreas de la extracción líquido-líquido anterior y se prosiguió a realizar 3 extracciones con porciones de 15 mL con alcohol etílico al 10% en agua destilada.

3.2.11. DERIVATIZACIÓN DE LOS ESTEROLES DE LAS MUESTRAS DE LAS OLLAS DE BARRO

Para el análisis de la fracción de los esteroides, se utilizan varios métodos para poder ser detectados. Lo usual es formar derivados trimetilsililéteres (TMS) y, para ello, se utilizan reactivos conocidos como silanizantes (Camarena-Fernández, 2011). Estos tipos de reactivos (por ejemplo, el N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida [BSTFA], es el reactivo más utilizado) son poco amigables con el ambiente.

Otra metodología consiste en analizarlos libremente, pero se corre el riesgo de que los compuestos que contienen protones ácidos, como en la fracción insaponificable, presenten interacciones fuertes con los componentes del inyector y la columna lo que con frecuencia lleva a resultados poco confiables (Ciliberto y Spoto, 2000).

En este caso, la derivatización consistió en agregar HCl al 5% en metanol, a través del condensador, de acuerdo con las cantidades que aparecen en la Tabla 2 y lo recomendado por Casio-Arreola y Luna-Estrada (2014), manteniendo la mezcla en ebullición durante 6 min. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 5 mL de hexano a través del condensador y se mantuvo a ebullición por 1 minuto más.

Pasado este tiempo se desconectó el condensador y se retiró el matraz de la parrilla de calentamiento. Inmediatamente se agregaron 15 mL de solución acuosa saturada de NaCl. Se tapó el matraz y se agitó vigorosamente durante 15 s mientras la mezcla se encontraba aún tibia. Finalmente, se dejó reposar la mezcla un par de minutos para que la solución de hexano con los esteroides flotara en el cuello del matraz.

3.2.12. AISLAMIENTOS DE LOS ESTEROLES Y ÁCIDOS GRASOS EN LAS MUESTRAS DE OLLAS DE BARRO Y CARNE DE VENADO Y ARMADILLO

El aislamiento se realizó de igual manera para las muestras de los esteroides y de ácidos grasos. Se agregó sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente utilizando la campana de extracción. Finalmente, las muestras se re-disolvieron en hexano grado cromatográfico y se colocaron en viales de vidrio color ámbar. Se mantuvieron en un cuarto frío a una temperatura de 6°C, para su próximo uso.

3.2.13. DETERMINACIÓN DE LOS ESTEROLES Y ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM) EN LAS MUESTRAS DE OLLAS DE BARRO Y CARNE DE VENADO Y ARMADILLO

Para el análisis e identificación de los esteroides (colesterol) y ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos, se utilizó un cromatógrafo de gases de la marca Agilent, modelo 6890N, con una columna capilar de fases DB-5MS (5% fenil-metilsilicón), de una longitud de 10 m, diámetro interno (D.I.) de 0.18 mm y un espesor de película de 0.18 μ , acoplado a un espectrómetro de masas marca LECO Imagen 5, modelo Pegasus 4D, con un modo de ionización de impacto electrónico (*EI*, por sus siglas en inglés). Las muestras fueron realizadas mediante una inyección conocida por su nombre en inglés como *Split-splitless*. Las determinaciones de los esteroides se realizaron por duplicado y las de los ésteres metílicos fueron realizados por triplicado. Las condiciones que se tuvieron al realizar los análisis cromatográficos fueron: temperatura de inyector 300°C, temperatura del horno de 100°C durante 1.7 min, después se llevó hasta 300°C con una razón de 20°C/min, durante 10 min. El gas de arrastre fue helio grado cromatográfico, la temperatura de la fuente de ionización fue de 200°C. Los resultados, tanto de los ácidos grasos como de los esteroides, se presentaron de forma cualitativa y las inyecciones fueron realizadas por personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química de la UNAM. Los compuestos fueron identificados con ayuda del software del equipo (LECO®

ChromaTOF® Optimized for Pegasus 4D), con los tiempos de retención arrojado por los cromatogramas y con el ion molecular característico de cada compuesto.



Imagen 5. Espectrómetro de masas utilizado en la USAI de la Facultad de Química de la UNAM

Como se explicó con anterioridad primero se realizó un experimento piloto para observar la factibilidad de la metodología. Una vez terminado el experimento piloto se analizaron las muestras correspondientes a la estructura de los fogones proporcionada por el Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM. Una vez que la metodología fue seleccionada se realizaron los análisis de los ácidos grasos y esteroides en las piezas arqueológicas con la finalidad de poner a prueba la hipótesis de la preparación de alimentos de origen animal, como parte de la alimentación en la zona de San Lorenzo perteneciente a la cultura Olmeca. Realizados los análisis y la identificación de los ácidos grasos y de los esteroides, en las piezas arqueológicas, se prosiguió a llevar a cabo una comparación entre los alimentos ahumados realizados en el experimento piloto la carne de venado y armadillo, dos animales que son utilizados como ingredientes en platos típicos de la zona de San Lorenzo. Cabe destacar que las determinaciones de las piezas arqueológicas fueron realizadas por triplicado y de forma cuantitativa. A continuación, en la Figura 8 se describe la metodología utilizada para el análisis de los ácidos grasos y esteroides en las muestras arqueológicas.

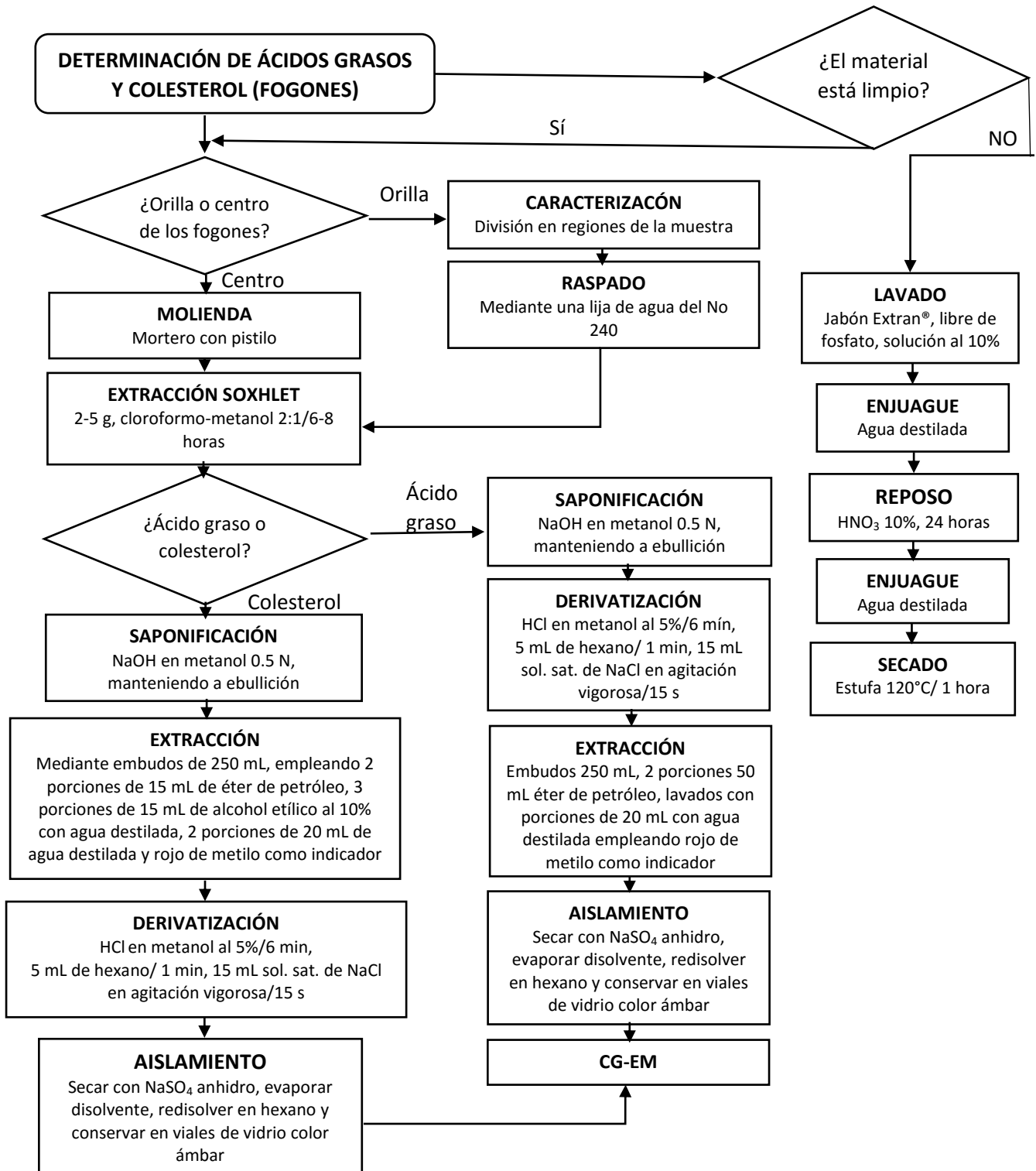


Figura 8. Diagrama seguido en las muestras arqueológicas para el análisis de ácidos grasos y colesterol

3.3. METODOLOGÍA SEGUIDA EN LAS MUESTRAS DE LOS FOGONES

3.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ARQUEOLÓGICAS PARA LA EXTRACCIÓN SOXLETH

Dependiendo de la localización de la pieza en la estructura de cada fogón, paredes para uno y fondo para el otro, se realizaron las siguientes preparaciones a las piezas para poder proseguir con el análisis de lípidos. La parte del centro de la estructura de uno de los fogones, al encontrarse solamente los restos, se prosiguió a realizar una molienda con un mortero y pistilo. Una vez terminada la muestra logró tener la apariencia de un polvo fino.

Las partes de la orilla o pared pertenecientes al otro fogón se trataron de forma diferente. Primero se caracterizaron las piezas. La primera pieza proporcionada por el personal del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM, se dividió en 4 regiones: FI, FD, FA y FE (fracciones izquierda, derecha, atrás y enfrente, respectivamente). Luego se prosiguió a raspar con una lija de agua de No. 240 para obtener un polvo fino como en la pieza anterior.

La segunda pieza de ese mismo fogón proporcionada de igual manera por el personal del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM, perteneciente a la orilla o pared de la estructura de este segundo fogón, solamente se caracterizó en una región, la parte interna de la cara (Imagen 1). Posteriormente, se prosiguió a raspar con una lija de agua de No. 240 para obtener un polvo fino.

3.3.2. EXTRACCIÓN SOXHLET PARA LAS MUESTRAS DE LOS FOGONES

Como ya se describió en el punto 3.2.6, se realizaron extracciones del material lipídico por el método Soxhlet, tanto para el análisis de ácidos grasos y esteroides. Para las muestras se hicieron extracciones Soxhlet, con 3 matraces bola de fondo plano previamente lavados y a masa constante con perlas de ebullición en una estufa a 120°C por 1 hora. Se pesaron de 3 a

5 g de muestra, sobre un papel filtro, se enrolló el papel y se colocó en el cartucho prosiguiendo a tapar el cartucho con algodón (evitando tocar la muestra) y colocándolo en el extractor Soxhlet. Se conectó el matraz al extractor, donde se encontraba el cartucho y se conectó al refrigerante. Posteriormente, se agregó la cantidad de disolvente suficiente (ya que los extractores no eran del mismo volumen). El disolvente utilizado para las piezas arqueológicas fue una mezcla de cloroformo:metanol 2:1(v/v) (Cañabate-Guerrero y Sánchez-Vízcaíno, 1995). Se pusieron a ebullición moderada en parrillas de calentamiento. El tiempo de extracción de la grasa dependió de la naturaleza de las muestras. El tiempo necesario para las extracciones de cada parte de los fogones fue de alrededor de 6 a 10 horas. Para verificar que se había extraído toda la grasa de la muestra, como ya se describió antes, se dejó caer una gota de disolvente y si no se observaban restos de grasa en el papel filtro, la extracción se daba por concluida. Una vez concluida la extracción, se retiró el refrigerante y el extractor junto con la muestra desengrasada, tratando de recuperar la mayor cantidad de disolvente. El equipo Soxhlet se retiraba antes de que se descargara el disolvente que se recuperaba y guardaba para un próximo tratamiento. Se prosiguió el calentamiento leve del matraz en una campana de extracción hasta que el disolvente que contenía el matraz se evaporó. Finalmente, el matraz se dejó enfriar en una campana de extracción para poder calcular el porcentaje de grasa mediante la fórmula química ya mencionada:

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{P - p}{M}$$

donde:

P= Masa en gramos del matraz con grasa

p= Masa en gramos del matraz sin grasa a masa constante

M= Masa en gramos de la muestra

3.3.3. SAPONIFICACIÓN DEL EXTRACTO ETÉREO DE LAS MUESTRAS DE LOS FOGONES

Como ya se mencionó, para el análisis de los ácidos grasos y esteroides se realizó una saponificación. La metodología que se realizó para la saponificación fue la misma que se describió en el punto 3.2.7 de la metodología del experimento piloto (uso de la metodología

obtenida de las normas NMX-K-306-SCFI-2006 y NMX-F-017-SCFI-2011, con las modificaciones propuestas por Casio-Arreola y Luna Estrada, 2014).

3.3.4. DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS FOGONES PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

Como ya se mencionó con anterioridad en el punto 3.2.8 se realizó una derivatización agregando HCl al 5 % en metanol. Finalmente, se dejó reposar la mezcla un par de minutos para que la solución de hexano con los ésteres metílicos flotara en el cuello del matraz.

3.3.5. EXTRACCIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LAS MUESTRAS DE LOS FOGONES

Para poder analizar y caracterizar los ésteres metílicos en el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas fue necesario realizar una separación de las fases de la mezcla obtenida después de la derivatización (muestras de ésteres metílicos, solución de sal y de hexano). Se transfirió la mezcla del matraz a un embudo de separación de 250 mL, en donde se realizaron 2 extracciones líquido-líquido cada una con porciones de 50 mL de éter de petróleo. Los extractos etéreos fueron lavados con porciones de 20 mL de agua destilada hasta que estuvieran libres de ácido usando también indicador rojo de metilo.

3.3.6. EXTRACCIÓN DE LOS ESTEROLES EN LAS MUESTRAS DE LOS FOGONES

Como se mencionó en el punto 3.2.9, una vez terminada la saponificación del extracto etéreo, se realizó una separación de la fracción no saponificable. Se desconectó el refrigerante, retirando el matraz de la parrilla de calentamiento y transfiriendo su contenido a un embudo de separación de 500 mL, donde se realizaron los lavados como ya se mencionó antes.

3.3.7. DERIVATIZACIÓN DE LOS ESTEROLES EN LAS MUESTRAS DE LOS FOGONES

Como se mencionó con anterioridad se llevó a cabo la derivatización que consistió en agregar HCl al 5% en metanol, a través del condensador, de acuerdo con lo recomendado por Casio-Arreola y Luna-Estrada (2014), la mezcla se mantuvo en ebullición durante 6 min. Finalmente, se dejó reposar la mezcla un par de minutos para que la solución de hexano con los esteroides flotara en el cuello del matraz.

3.3.8. AISLAMIENTOS DE LOS ESTEROLES Y ÁCIDOS GRASOS EN LOS FOGONES

El aislamiento se realizó de igual manera para las muestras de los esteroides y de ácidos grasos. Se agregó sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente utilizando la campana de extracción. Finalmente, las muestras se re-disolvieron en hexano grado cromatográfico y se colocaron en viales de vidrio color ámbar. Se mantuvieron en un cuarto frío a una temperatura de 6°C, para su próximo uso.

3.3.9. DETERMINACIÓN DE LOS ESTEROLES Y ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM) EN LAS MUESTRAS DE LOS FOGONES

Para el análisis e identificación de los esteroides (colesterol) y ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos, se utilizó el mismo cromatógrafo de gases ya mencionado, acoplado a un espectrómetro de masas. Las muestras se inyectaron con el modo *Split-splitless*. Las determinaciones de los esteroides se realizaron por duplicado y las de los ésteres metílicos fueron realizados por triplicado.

Las condiciones que se mantuvieron al realizar los análisis cromatográficos fueron las mismas ya descritas previamente. Los resultados, tanto de los ácidos grasos como de los esteroides, se presentaron de forma cualitativa y las inyecciones fueron realizadas por

personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química de la UNAM. Los compuestos fueron identificados como ya se mencionó con el software del equipo (LECO® ChromaTOF® optimized for Pegasus 4D), con los tiempos de retención arrojado por los cromatogramas y con el ion molecular característico de cada compuesto.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados derivados de esta interesante investigación.

4.1. RESULTADOS DE LAS OLLAS DE BARRO, LA CARNE DE VENADO Y LA CARNE DE ARMADILLO EN EL EXPERIMENTO PILOTO

1) PREPARACIÓN, AHUMADO Y LIOFILIZACIÓN DE LA CARNE DE VENADO Y ARMADILLO

En la Imagen 6 se aprecian los trozos lavados y cortados de la carne de venado y de armadillo antes del proceso de ahumado. En la Imagen 7 se muestran ya ahumadas. La Imagen 8 presenta las carnes secas por liofilización ya que este método de secado permite operar a temperaturas menos altas evitando las reacciones de las proteínas y los hidratos de carbono y dificultando la extracción de los lípidos (Lupano, 2013). Puede verse su color claro.



Imagen 6. Carne de venado (lado izquierdo) y carne de armadillo (lado derecho)



Imagen 7. Carnes ahumadas de venado (derecha) y armadillo (izquierda)



Imagen 8. Carnes liofilizadas de venado (derecha) y de armadillo (izquierda)

2) RASPADO DE LAS OLLAS DE BARRO

En la Imagen 9 se puede observar la depositación en las ollas de barro de los jugos de la carne (armadillo y venado) donde, al finalizar, fueron raspados con una lija de agua con la finalidad de obtener un polvo fino, del cual se realizaron las extracciones Soxhlet para la determinación de los esteroides.



Imagen 9. Preparación de las muestras de las ollas de barro

3) OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA CARNE DE VENADO Y DE ARMADILLO

En la Imagen 10 se aprecia el equipo Soxhlet, utilizado para la extracción del material lipídico, en las diferentes muestras utilizadas (carne de venado, carne de armadillo y los fragmentos de los fogones).



Imagen 10. Equipos Soxhlet utilizados para la extracción de grasas

En la Tabla 3 se observan los datos que se registraron en la extracción del material lipídico de las muestras biológicas, observando que las muestras analizadas provenientes de la carne de armadillo contuvieron una mayor cantidad de grasa que la de venado debido a las características de composición de macronutrientes de cada carne.

Tabla 3. Datos de la extracción, saponificación y derivatización del material lipídico en la carne de venado y armadillo

Muestra		Masa muestra* (g)	Tiempo (horas)	Masa de la grasa (g)	Grasa (%)	Promedio de grasa extraída (%)	Volumen de NaOH 0.5 N en metanol (mL)	Volumen de HCl 5% en metanol (mL)
Carne de venado	1	3.046	6	0.169	5.574	5.944±0.9	4	5
	2	3.216	6	0.198	6.178		4	5
	3	3.392	6	0.206	6.081		4	5
Carne de armadillo	1	2.093	6	0.853	40.774	37.477±3.9	8	9
	2	2.091	6	0.807	38.619		8	9
	3	2.090	6	0.690	33.040		8	9

* masa seca

En cuanto al análisis de los ácidos grasos, los cuales se transformaron en sus respectivos ésteres metílicos (ya que estos compuestos son menos polares y térmicamente más estables), se llevó a cabo una saponificación, derivatización, extracción y aislamiento. Los ácidos grasos pueden encontrarse en la naturaleza en su estado libre (no esterificados); sin embargo, en su mayoría se encuentran como ésteres unidos a moléculas de glicerol, colesterol o alcoholes alifáticos. Con la saponificación se separaron los ácidos grasos de las demás moléculas y una vez que los ácidos grasos se encontraban en su forma libre, se derivatizaron las muestras para que los ácidos grasos que estaban como ésteres se transesterificaran (Figura 9). En la esterificación, el paso inicial fue la protonación del ácido para dar el ion (1), el cual sufrió una reacción con el alcohol para dar un compuesto intermediario, y (2) éste a su vez perdió un protón para convertirse en el éster (3). Cada paso en este proceso es reversible pero en presencia de un gran exceso del alcohol, el punto de equilibrio de la reacción es desplazado para que la esterificación se realice (López, 2008).

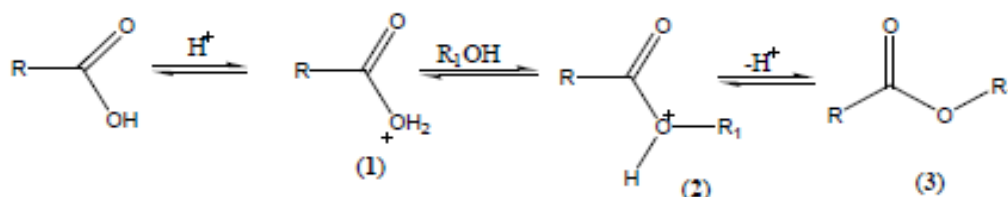


Figura 9. Esterificación de los ácidos grasos con catálisis ácida (López, 2008)

La trans-esterificación ocurre bajo condiciones similares (Figura 10). La protonación del éster es seguida por la adición del alcohol para dar el intermediario (4) el cual se disocia para, posteriormente, dar el éster (6). El agua debe ser una vez más excluida. Las condiciones preferidas para esterificación o trans-esterificación de ácidos carboxílicos son, por consiguiente, un exceso del alcohol con el que se quiere esterificar y en ausencia de agua (López, 2008).

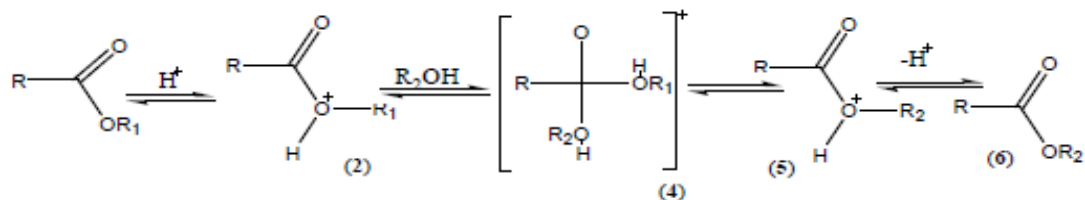


Figura 10. Trans-Esterificación de lípidos por catálisis ácida (López, 2008)

Para realizar estos dos equilibrios, en este estudio se sustituyó el reactivo de trifluoruro de boro (BF_3), el cual es un disolvente fluorado, por el HCl en metanol al 5%, ya que éste es el más citado y es usado con más frecuencia en este tipo de reacciones (López, 2008). En la práctica, las pequeñas cantidades de agua formadas no debieran afectar la esterificación significativamente y el reactivo tiene una vida útil de cerca de dos semanas a temperatura ambiente o más larga si se refrigera. Por el contrario, el BF_3 tiene una vida de anaquel limitada aún cuando se refrigere y el uso de soluciones de dudosa vida de anaquel o demasiado concentradas puede producir otros compuestos químicos y pérdidas de cantidades apreciables de ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, como ya se mencionó, el BF_3 es tóxico, razón por la cual en esta investigación no se empleó. En esta investigación se usó el HCl en metanol, preparado en el laboratorio y, aunque se recomienda prepararlo burbujeando cloruro de hidrógeno gaseoso seco en el metanol anhidro, se observó que la modificación sugerida en la metodología no fue un factor que ocasionara que las reacciones no se llevaran a cabo. Las muestras fueron analizadas en el cromatógrafo de gases-espectrofotómetro de masas bajo las condiciones descritas en la sección de metodología.

Como particularidad en los espectros de masas de los ésteres metílicos se presenta una señal carga masa (m/z) = 74 y 87 u o Da o uma. Estas señales se atribuyen al reordenamiento de McLafferty, un estado de transición de seis miembros que resulta en una transferencia del hidrógeno γ y una ruptura β (Figura 11) propio de los ésteres metílicos (Christie, 2015). Los metilésteres muestran las reacciones esperadas para el grupo carbonilo-adición α y adición β con reorganización del hidrógeno γ (Figura 12). La intensidad de los fragmentos de McLafferty dependen del número de enlaces π en la molécula (López, 2008).

El ión alquilo ($M-59$)⁺ y el ion CH_3O^+ son muy pequeños, excepto los metilésteres de baja masa molecular. Además, la descomposición de la mitad de los alquilos produce los iones característicos $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}^+$ y $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}^+$.

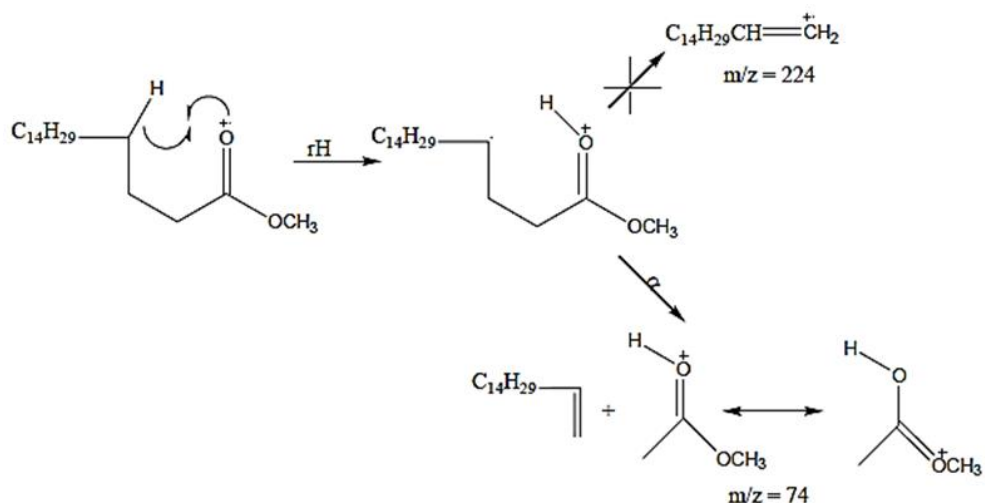


Figura 11. Rearreglo de McLaffety resultado del ion de masa molecular 74 (López, 2008)

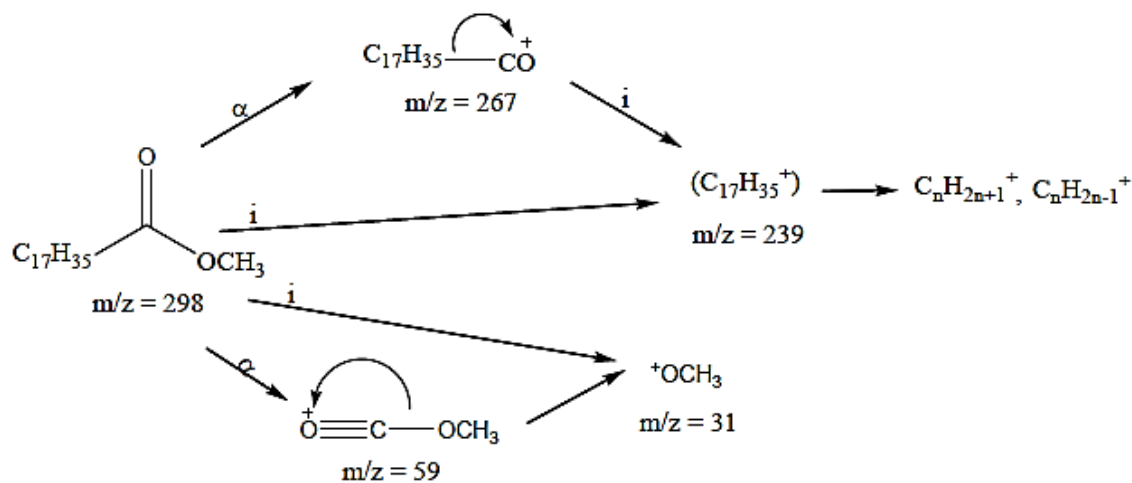


Figura 12. Esquema de fragmentación por IE dando como resultado el $[M-31]^+$ (López, 2008)

En la Tabla 4 se enlistan los ésteres metílicos y esteroides identificados en las muestras biológicas. Cabe mencionar que a pesar de encontrarse la presencia de colesterol en la carne de venado, la metodología realizada no era excluyente para esteroides, por lo que la presencia de este esteroide puede deberse a su alta concentración en la carne de venado.

Tabla 4. Compuestos identificados en las muestras de armadillo (*Dasypus novemcinctus*) o de venado (*Odocoileus virginianus*) mediante CG-EM

	Proporción en carne de venado			Proporción en carne de armadillo			Ion molecular (m/z) identificado
	1 (%)	2 (%)	3 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Éster metílico del ácido heptanoico	--	--	0.144	--	--	--	144
Éster metílico del ácido pelargónico	--	--	--	--	--	0.038	172
Éster metílico del ácido cáprico	--	--	--	--	2.783	0.167	186
Éster metílico del ácido undecanoico	--	--	--	0.051	0.362	0.039	200
Éster metílico de (E)- 9-ácido dodecanoico	--	--	--	0.242	--	--	212
Éster metílico del ácido láurico	0.327	0.275	0.279	1.987	--	1.289	214
Éster metílico del ácido tridecanoico	0.140	--	0.151	3.045	3.622	0.940	228
Éster metílico del x- ácido tetradecanoico	0.330	--	--	--	--	--	240
Éster metílico del x,y-ácido mirístico	--	--	--	--	18.796	0.941	238
Éster metílico del ácido mirístico	5.342	2.490	3.353	4.523	5.205	--	242
Éster metílico de x-ácido pentanoico	--	--	--	1.057	1.142	--	254
Éster metílico del ácido pentanoico	--	--	--	3.856	0.905	2.971	256
Éster metílico de (Z)- 7-ácido hexanoico	--	5.473	--	--	--	--	268
Éster metílico de (Z)- 9-ácido hexanoico	7.712	--	6.854	5.055	--	4.238	268
Éster metílico del ácido palmítico	19.952	31.216	19.758	1.636	--	12.883	270
Éster metílico del ácido margárico	0.504	0.346	0.918	1.963	4.659	3.101	284
Éster metílico del x,y,z- ácido octanoico	27.749	--	--	--	--	--	292
Éster metílico del 8,11- ácido octanoico	--	--	--	6.971	--	--	294
Éster metílico del (E,E)-9,11- ácido octanoico	--	--	--	--	--	25.667	294
Éster metílico del (Z,Z)-9,12- ácido octanoico	--	--	10.440	--	--	--	294
Éster metílico del 6- ácido octadecanoico	--	51.591	--	--	--	--	296
Éster metílico del (E)-9-ácido octanoico	27.619	--	--	28.425	27.061	25.667	296
Éster del ácido oleico	--	--	--	8.664	--	--	282
Éster metílico del (E)-8-ácido octanoico	--	--	42.754	--	--	--	296
Éster metílico del ácido esteárico	7.691	7.961	9.789	8.830	--	--	298
Éster metílico del x-ácido nonadecanoico	--	--	--	1.117	--	0.816	310
Éster metílico del ácido nonadecanoico	--	--	--	0.723	0.753	0.531	312
Éster metílico del x,y,z- ácido eicosano	--	--	1.786	--	--	--	320
Éster metílico del x-ácido araquidónico	--	--	--	4.459	--	3.003	324
Éster metílico del ácido araquidónico	--	--	0.116	0.913	0.926	0.191	326
Éster metílico del ácido behémico	--	--	0.018	0.184	--	--	354
Éster metílico del ácido tricosanoico	--	--	--	0.086	--	0.049	368
Ester metílico del ácido lignocérico	--	--	--	0.092	--	0.06	382
Colesterol	2.086	--	2.186	--	--	--	386

% = Porcentaje del área bajo la curva

4) RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN DE LOS ESTEROLES EN LAS OLLAS DE BARRO

Como se mencionó con anterioridad, uno de los objetivos de esta investigación fue la búsqueda de compuestos como los esteroides. Para esto se utilizaron las muestras de las ollas de barro en donde se habían depositado los jugos de la carne. En la Tabla 5 se aprecian los datos que se obtuvieron una vez finalizada la extracción Soxhlet en las ollas de barro que contenían la carne de armadillo (A) y la carne de venado (V), apreciándose que el porcentaje de grasa extraída fue mayor en las ollas donde se depositaron los jugos de la carne de armadillo que los de la carne de venado.

Tabla 5. Datos de la extracción, saponificación y derivatización del material lipídico en las ollas de barro

Muestra		Masa de la muestra (g)	Masa de la grasa (g)	Grasa extraída (%)	Promedio de grasa extraída (%)	Tiempo de extracción (horas)	Volumen de NaOH 0.5 N en metanol (mL)	Volumen de HCl 5% en metanol (mL)
Vasija de barro (A)	1	4.776	0.348	7.292	6.255	4	4	5
	2	4.129	0.215	5.217		4	4	5
Vasija de barro (V)	1	4.422	0.228	5.174	4.805	4	4	5
	2	4.623	0.205	4.436		4	4	5

En la Tabla 6 se presentan los esteroides detectados en las ollas de barro, donde se destaca el colesterol en forma libre y la presencia de algunos oxisteroides que se tenían contemplados encontrar en las ollas. Los dos compuestos de oxidación del colesterol, que se detectaron, probablemente se formaron al momento de llevarse a cabo la saponificación, ya que en la bibliografía se menciona que al llevarse a cabo el mecanismo de autooxidación del colesterol, causado por el oxígeno molecular triplete ($^3\text{O}_2$), forma dos epímeros del 7-hidroperóxido del colesterol (α y β). Estos dos hidroperóxidos son térmicamente inestables y se descomponen de forma secundaria dando lugar a 7α -hidroxicolesterol, 7β -

hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol. El 7-cetocolesterol en condiciones de temperaturas altas y en contacto con un medio básico se descompone dando lugar a la molécula del 3,5-colestadien-7-ona (Boatella y col., 1995).

Tabla 6. Esteroles encontrados en las ollas de barro empleadas en el experimento piloto

Compuesto	Porcentaje encontrado en la olla de barro (A)		Porcentaje encontrado en la olla de barro (V)		Ion molecular (m/z)
	1 (%)	2 (%)	1 (%)	2 (%)	
(3á)-Colesta-4,6-dien-3-ol	12.505	-----	-----	1.899	384
Colesterol	31.983	-----	0.443	12.275	386
3,5-colestadien-7-ona	18.342	-----	-----	2.781	382

% = Porcentaje del área bajo la curva

En la Figura 13 se muestra la descomposición del colesterol pasando por el 7-cetocolesterol. Como se aprecia en los cromatogramas (Figuras 14 y 15), la presencia de los picos con el número 1 representan la fracción de los esteroides (colesterol libre y formas oxidadas del colesterol) en las muestras de las ollas. Estas evidencias indican que sí es posible detectar esta fracción en los residuos de material cerámico.

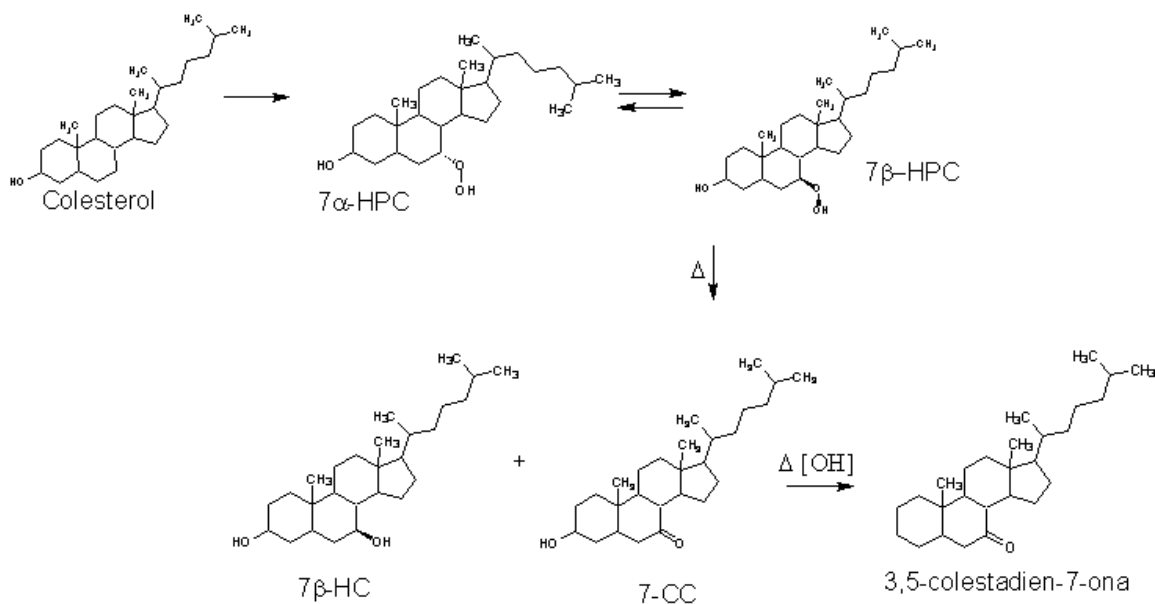


Figura 13. Autooxidación del colesterol (Boatella y col., 1995)

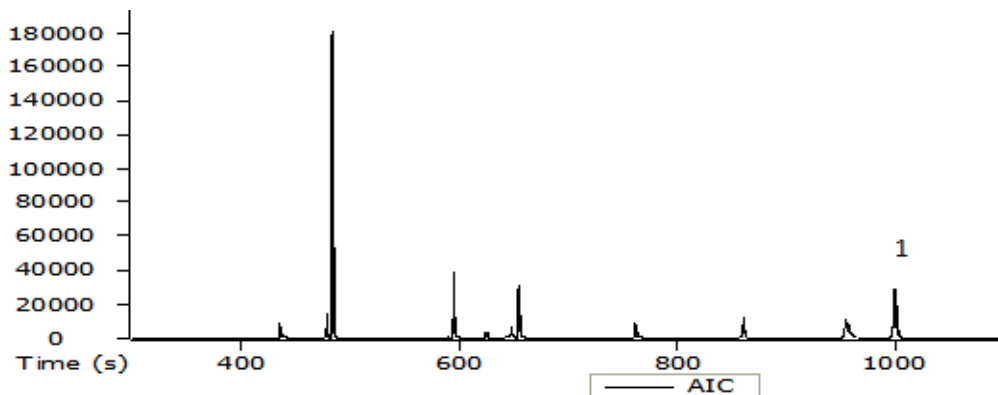


Figura 14. Cromatograma de muestra de la olla con restos de grasas de armadillo

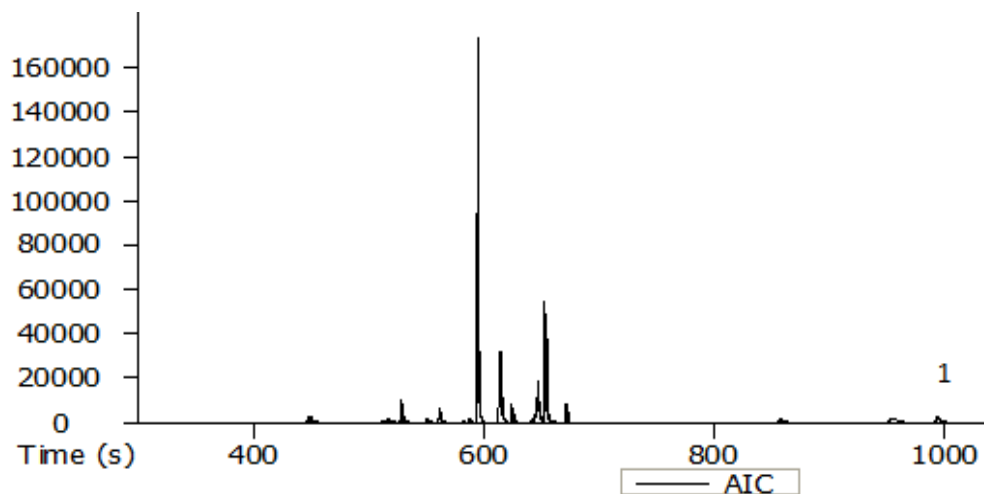


Figura 15. Cromatograma de muestra de la olla con restos de grasas de venado

4.2. RESULTADOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y ESTEROLES PRESENTES EN LOS FRAGMENTOS DE FOGONES

1) RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN DE ESTEROLES EN EL PRIMER FOGÓN (PARED U ORILLA)

Como se mencionó con anterioridad, uno de los fragmentos perteneciente a las paredes de uno de los fogones (Fogón 1) se caracterizó, dividiéndolo en cuatro regiones como se

muestra en la Imagen 11. Una vez caracterizado se prosiguió a realizar las metodologías ya descritas para el análisis de ácidos grasos y esteroides por triplicado.

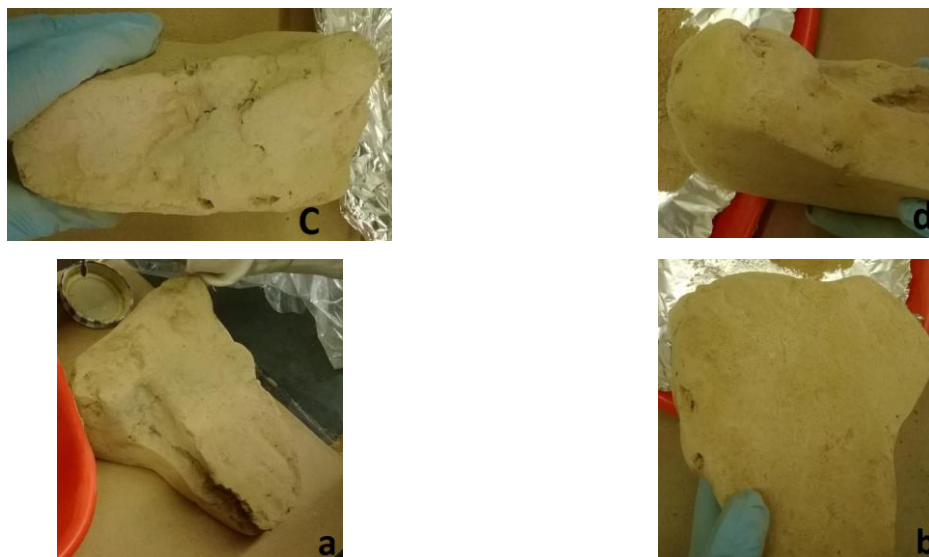


Imagen 11. Caracterización del primer fogón: a) región FI, b) región FD), c) región FA, d) región FE (Imagen 1, Fotografía superior izquierda)

En la Tabla 7 se proporcionan los porcentajes de grasa extraída en las diferentes muestras del primer fogón con las cuales se realizó la determinación de los esteroides, observando que en la muestra donde se encuentra un mayor porcentaje de grasa es en el fragmento del centro del fogón, lo cual indica que en esta parte de la estructura es donde se depositaba la mayor parte de la grasa de los alimentos que eran preparados en él.

La derivatización realizada en esta investigación es una propuesta para remplazar la silanización para obtener compuestos más estables y tiempos más cortos de análisis.

Algunos agentes silanizantes, entre los cuales se encuentran: hexametildilazano (HMDS), N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N- trimetilsilimidazol (TMSI), son los agentes más utilizados, para conseguir esta silanización. Normalmente, se disuelve el concentrado final de la saponificación en piridina y se añade el agente silanizante o una mezcla de éste con el catalizador. Cabe mencionar que con esta mezcla de reactivos se debe dejar un tiempo mínimo de 30 min a temperatura ambiente (Boatella y col., 1994).

Tabla 7. Datos de la extracción Soxhlet, saponificación y derivatización en los fragmentos de los dos fogones para el análisis de esteroides

Muestra de fogón		Masa de la muestra (g)	Masa de la grasa (g)	Grasa extraída (%)	Promedio de grasa extraída (%)	Volumen de NaOH 0.5 N en metanol (mL)	Volumen de HCl al 5% en metanol (mL)	Tiempo (horas)
Fogón 1*(FI)	1	2.241	0.019	0.874	1.210± 0.460	4	5	4
	2	2.136	0.032	0.152		4	5	4
	3	2.105	0.025	1.230		4	5	4
Fogón 1*(FD)	1	2.111	0.018	0.857	0.477± 0.336	4	5	4
	2	2.164	0.007	0.360		4	5	4
	3	2.310	0.005	0.216		4	5	4
Fogón 1*(FA)	1	2.270	0.003	0.145	0.261± 0.033	4	5	4
	2	2.382	0.002	0.100		4	5	4
	3	2.118	0.004	0.207		4	5	4
Fogón 1*(FE)	1	2.046	0.005	0.278	0.151± 0.053	4	5	4
	2	2.013	0.004	0.218		4	5	4
	3	2.080	0.006	0.288		4	5	4
Fogón 1 (otra pared u orilla)	1	5.019	0.025	0.508	0.6266 ± 0.125	4	5	6
	2	5.031	0.038	0.757		4	5	6
	3	5.027	0.030	0.614		4	5	6
Fogón 2 (fondo)	1	5.011	0.034	0.680	0.6964± 0.079	4	5	6
	2	5.075	0.039	0.782		4	5	6
	3	4.693	0.029	0.626		4	5	6

Donde: FA= parte trasera del fogón 1*, FE= parte frontal del fogón 1*, FI= parte izquierda de fogón 1*, FD= parte derecha del fogón 1*, fogón 1= Orilla del fogón dividida en 1 región y fogón 2= fondo del fogón

En los cromatogramas (Figuras 16, 17 y 18) se pueden observar los picos identificados con los números 1 para colesterol y 2 para estigmasterol, mientras que en la Tabla 8 se aprecian los porcentajes de los esteroides que se identificaron en los fragmentos de los fogones. A pesar de que se realizó una derivatización para detectar compuestos más estables, en el fragmento del fogón 2 solamente se identificaron esteroides libres. Esto podría deberse a que, probablemente, en este tipo de reacciones el agua compite con los grupos hidroxilo de los compuestos oxidados del colesterol (algunos formados por las condiciones al realizar la saponificación), con lo cual en su presencia puede ser incompleta. Por otro lado, estos derivados permanecen sin hidrolizarse tan solo unos días a -20°C (Boatella y col., 1994). Los demás cromatogramas de las muestras analizadas se encuentran en el Anexo A.

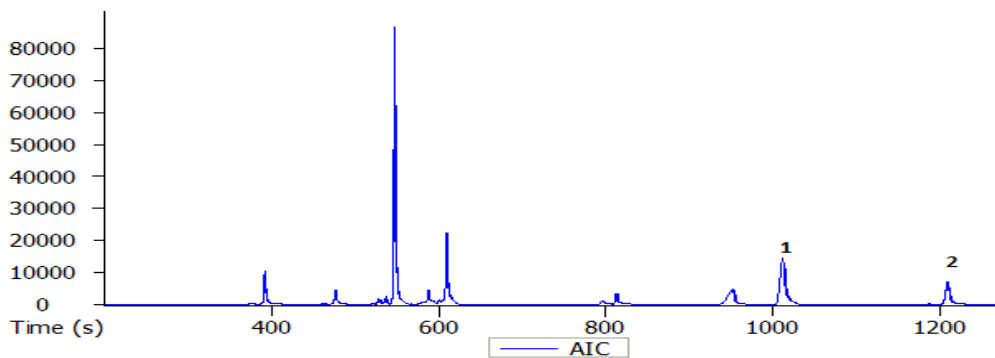


Figura 16. Cromatograma de orilla del fogón 1

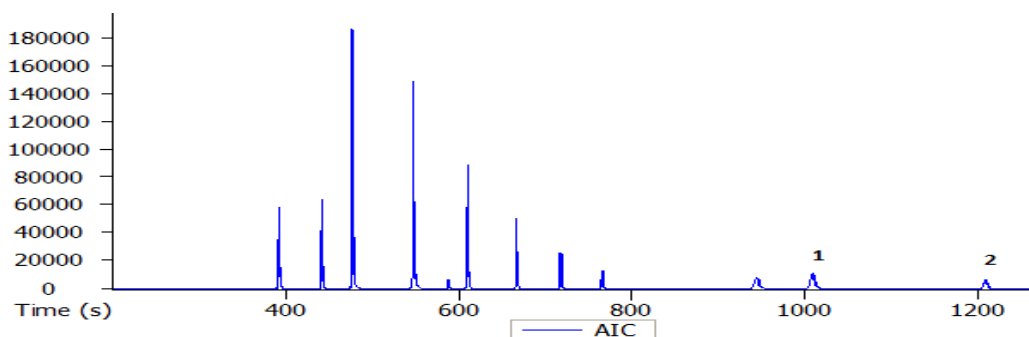


Figura 17. Cromatograma del fogón 2

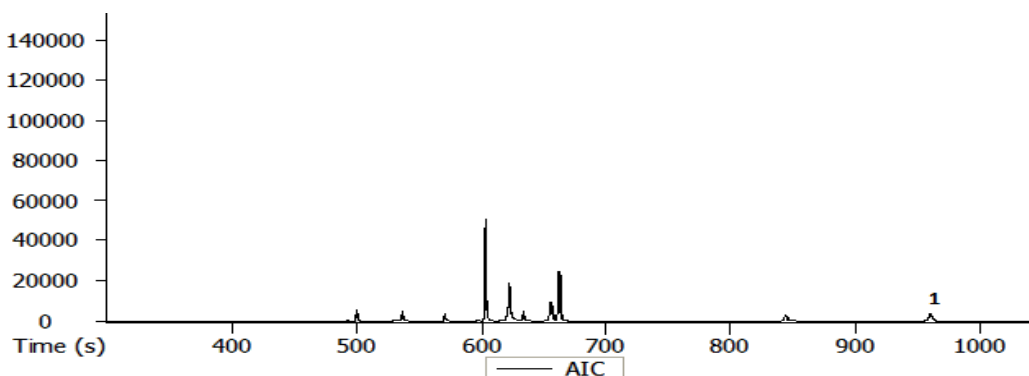


Figura 18. Cromatograma parte trasera del fogón 1*

Tabla 8. Esteroles encontrados en las muestras de los fragmentos de fogón

Molécula	Restos de fogón 1* (%)	Restos de fogón 1 (%)	Restos de fogón 2 (%)	Ion molecular (m/z)
Colesterol	1.26	17.206	26.121	386
Estigmasterol	-----	3.656	7.112	412

Fogón 1*: Orilla del fogón dividida en 4 regiones, fogón 1: Orilla del fogón dividida en 1 región y fogón 2: fondo del fogón

%= Porcentaje de área bajo la curva

Entre los esteroides que se encontraron presentes en los fragmentos de los fogones, se destacan el colesterol y el estigmasterol. El colesterol es uno de los biomarcadores más importantes, ya que se encuentra en concentraciones altas en los alimentos de origen animal, encontrándose en mayor proporción en el fragmento perteneciente a la parte del fondo de la estructura del fogón 2, mientras que en los fragmentos pertenecientes a las paredes del fogón 1* y 1 se encontró colesterol pero en menor proporción, probablemente porque en la fracción del fondo del fogón 2 se depositaban los jugos de los animales que eran cocinados y podría confirmarse que formaban parte de la alimentación de la población olmeca.

Otro de los esteroides que se logró identificar fue el estigmasterol. Este esteroide es característico de las plantas. Esta molécula se encontró en mayor porcentaje en el fragmento perteneciente al fondo del fogón 2. En estudios anteriores analizados en los restos de este fogón por investigadores del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM se observó que esta muestra de fogón contenía tierra con abundante ceniza, en la cual se realizaron estudios de fitolitos encontrándose en ellos restos de palma (*Areceaceae* o *Palmaceae*). Esta evidencia parece ser indicativa del uso de la palma como combustible en los fogones (Cyphers y col., 2013). Por ello, al encontrar en estos experimentos evidencias de estigmasterol (esteroide representativo de las plantas) puede reforzarse la hipótesis de que al haber encontrado fitolitos de palma se corroboraría que la usaban como combustible para el ahumado de alimentos.

2) RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DEL MATERIAL LIPÍDICO DE LOS FRAGMENTOS DE FOGONES EN LA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

En la Tabla 9 se proporcionan los porcentajes de grasa extraída en las diferentes muestras de los dos fogones con las cuales se realizó la determinación de los ésteres metílicos. Se observa que en la muestra donde se encuentra un mayor porcentaje de grasa es en el fragmento del fondo del fogón 2, indicando que tal vez en esta parte de la estructura es donde se depositaba la mayor proporción de la grasa de los alimentos que eran preparados.

Tabla 9. Datos de la extracción Soxhlet, saponificación y derivatización en los fragmentos de los dos fogones estudiados para el análisis de ésteres metílicos

Muestra de fogón		Masa de la muestra (g)	Masa de la grasa (g)	Grasa extraída (%)	Promedio de grasa extraída (%)	Volumen de NaOH 0.5 N en metanol (mL)	Volumen de HCl 5% en metanol (mL)	Tiempo (horas)
Fogón 1*(FI)	1	2.948	0.006	0.203	0.296± 0.107	4	5	4
	2	2.458	0.006	0.272		4	5	4
	3	2.051	0.009	0.414		4	5	4
Fogón 1*(FD)	1	2.825	0.002	0.081	0.191± 0.124	4	5	4
	2	2.587	0.004	0.166		4	5	4
	3	2.055	0.006	0.325		4	5	4
Fogón 1*(FA)	1	2.286	0.009	0.424	1.055± 0.576	4	5	4
	2	2.292	0.027	1.191		4	5	4
	3	2.010	0.031	1.552		4	5	4
Fogón 1*(FE)	1	2.397	0.011	0.492	0.701± 0.181	4	5	4
	2	2.697	0.022	0.819		4	5	4
	3	2.057	0.016	0.792		4	5	4
Fogón 1	1	2.1093	0.009	0.459	0.492 ± 0.037	4	5	6
	2	2.0845	0.011	0.532		4	5	6
	3	2.0664	0.010	0.483		4	5	6
Fogón 2	1	2.9070	0.014	0.489	0.503 ± 0.014	4	5	6
	2	2.6408	0.013	0.503		4	5	6
	3	2.6945	0.014	0.518		4	5	6

Donde: FA= parte trasera del fogón 1*, FE= parte frontal del fogón 1*, FI= parte izquierda de fogón 1*, FD= parte derecha del fogón 1*, fogón 1= Orilla del fogón dividida en 1 región y fogón 2= fondo del fogón

4.3. RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LAS MUESTRAS DE FOGONES Y SU COMPARACIÓN CON LAS CARNES DE VENADO Y ARMADILLO

En la Tabla 10 se presentan los compuestos identificados de las muestras de venado, armadillo y los fragmentos de los dos fogones, resaltándose una mayor variedad de ácidos grasos identificados en la carne de armadillo debido a su alto contenido de grasa. Como observación general en la carne de armadillo, los ácidos que se encontraron en mayor abundancia fueron: el ácido oleico (27.05%), los isómeros del ácido oleico (17.19%) y el isómeros del ácido linoleico (10.88%). En la carne de venado fueron: el ácido palmítico (23.64%), el ácido oleico (14.25%) y el ácido esteárico (8.48%).

Tabla 10. Resumen de los compuestos determinados en muestras de los dos fogones en estudio, armadillo (*Dasyurus novemcinctus*) y venado (*Odocoileus virginianus*) por cromatografía e gases/espectrometría de masas, CG-EM

	Éster metílico del ácido :	PM	Nombre trivial del ácido	Armadillo (%)	Venado (%)	Fogón 1* (%)	Fogón 1 (%)	Fogón 2 (%)
1	Heptanoico	144	Ácido enántico	-----	0.048	-----	-----	-----
2	Nonanoico (C9:0)	172	Ácido pelargónico	0.012	-----	0.114	-----	-----
3	Decanoico (C10:0)	186	Ácido cáprico	1.401	-----	1.720	-----	0.717
4	Undecanoico (C11:0)	200	Ácido undecílico	0.151	-----	-----	-----	-----
5	Cyclopropanenonanoico	212	-----	0.123	-----	-----	-----	-----
6	9-dodecenoico (E) (C12:1)	212	Ácido lauroleico	9.101	-----	-----	-----	-----
7	Dodecanoico (C12:0)	214	Ácido láurico	1.980	0.294	-----	-----	-----
8	Tridecanoico (C13:0)	228	Ácido tridecílico	4.145	0.097	0.100	-----	-----
9	10-metil dodecanoico	228	-----	0.056	-----	-----	-----	-----
10	12,13-tetradecadienoico (14:2)	238	-----	6.579	-----	-----	-----	-----
11	9 tetradecenoato (C14:1)	240	Ácido miristoleico	0.324	0.110	-----	-----	-----
12	Tetradecanoico (C14:0)	242	Ácido mirístico	5.306	1.864	4.617	1.053	2.376
13	Cis-10 pentadecanoico (C15:1)	254	-----	1.100	-----	-----	-----	-----
14	9-metil tetradecanoico	256	-----	1.510	0.650	0.211	-----	-----
15	Pentadecanoico (C15:0)	256	Ácido pentadecílico	2.578	-----	1.486	-----	16.538
16	9-hexadecanoico (E) (C16:1)	268	Ácido palmitoleico	3.098	6.680	-----	-----	-----
17	11-hexadecanoico (C16:1)	268	Ácido palmitoleico	-----	-----	6.391	-----	-----
18	Hexadecanoico (C16:0)	270	Ácido palmítico	10.433	23.642	15.595	23.277	28.227
19	7 metil-6-hexadecenoico	282	-----	0.598	-----	-----	-----	-----
21	Heptadecanoico (C17:0)	284	Ácido margárico	3.241	0.589	0.816	-----	-----
22	6,9-octadecadienoico (6,9-18:2)	294	-----	10.879	-----	-----	-----	-----
23	9,12-octadecadienoico (Z,Z) (18:2)	294	Ácido linoleico	-----	3.480	1.508	-----	-----
24	9-octadecanoico (E) (C18:1)	296	Ácido oleico	27.051	14.251	0.159	-----	-----
25	11-octadecanoico (E) (C18:1)	296	-----	17.197	-----	4.797	-----	4.032
26	Octadecanoico (C18:0)	298	Ácido esteárico	10.648	8.481	10.755	13.517	18.054
27	Metil 11 nonadecanoato (C19:1)	310	-----	0.644	-----	-----	-----	-----
28	Nonadecanoico (C19:0)	312	Ácido nonadecílico	0.669	-----	-----	-----	-----
29	Cis-11 eicosanoico (20:1)	324	Ácido gadoleico	2.487	-----	-----	-----	-----
30	Eicosanoico (C20:0)	326	Ácido araquídico	0.613	0.038	0.479	-----	0.656
31	Heneicosanoico (C21:0)	256	-----	0.053	-----	-----	-----	-----
32	Docosanoico (C22:0)	354	Ácido behénico	0.182	0.006	0.614	-----	1.157
33	Tricosanoico (C23:0)	368	-----	0.045	-----	0.094	-----	-----
34	Tetracosanoico (C24:0)	382	Ácido lignocérico	0.051	-----	0.045	-----	0.6938

% = porcentaje del área bajo la curva. Fogón 1*: Orilla del fogón dividida en 4 regiones, fogón 1: Orilla del fogón con una región, fogón 2: fondo del fogón

A este respecto, es importante mencionar que para interpretar los resultados de los residuos de lípidos los arqueólogos emplean dos criterios que, a continuación, se mencionan:

a) El primero utiliza proporciones de ácidos grasos:

Usa la relación aproximada del ácido palmítico (C16:0) que es un ácido graso saturado más común y abundante en las plantas que en los animales y el ácido esteárico (C18:0), que es más abundante en las grasas animales que en las plantas:

- Una proporción de C16:0/C18:0 mayor que 1 indicaría que los residuos provienen de fuente vegetal, aunque esto debe corroborarse con la presencia de ácidos grasos insaturados o biomarcadores relevantes.
- Una proporción de C16:0/C18:0 menor que 1 puede indicar que los residuos provienen de una fuente animal, especialmente cuando hay pocos ácidos grasos insaturados presentes (Reber y Evershed, 2006).

b) El segundo utiliza biomarcadores:

Compuestos únicos para un recurso o grupo de recursos en particular, como el colesterol en la carne, los fitoesteroles en las plantas o ciertos terpenos en resinas (Reber y Evershed, 2004).

1) FOGÓN 1* Y SU COMPARACIÓN CON LA CARNE DE ARMADILLO (*Dasyus novemcinctus*) Y DE VENADO (*Odocoileus virginianus*)

Los ésteres metílicos que se encontraron en un mayor porcentaje en el fragmento del fogón 1*, perteneciente a la pared de la estructura, fueron: el ácido palmítico (15.59%), el ácido esteárico (10.75%) y el ácido palmitoleico (6.39%). Comparando con la muestra de armadillo, los ácidos grasos encontrados en común fueron, los ácidos pelargónico, cáprico, tridecanoico, mirístico, 9-metiltetradecanoico, pentadecanoico, palmitoleico, palmítico, margárico, oleico, isómeros del ácido oleico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido tricosanoico y, finalmente, el tetracosanoico. Al comparar con las muestras de venado los ácidos grasos encontrados en común fueron los ácidos tridecanoico,

mirístico, 9-metiltetradecanoico, palmítico, margárico, linoleico, oleico, ácido esteárico, araquídico y behénico.

Derivado de los resultados de la Tabla 10 se observa que en todas las muestras hubo una mayor presencia de ácidos grasos saturados que de insaturados, debido a que estos compuestos pudieron sufrir algún tipo de degradación bacteriana y/o química (pirólisis y/u oxidación) a lo largo de los siglos. Además, se observó que el armadillo (16 ácidos metílicos) tuvo una mayor presencia de ácidos en común con el fogón (17 ácidos metílicos identificados) que con las muestras de venado (10 ácidos metílicos).

Se determinó, además, un perfil de ácidos grasos en el que se esperaba la identificación de colesterol, que indicaría si los alimentos que se consumían en San Lorenzo eran de origen animal. Sin embargo, éste solamente se identificó en una determinación; atribuyéndose a la baja proporción en que se encuentra en el fogón 1*. Por ello, se recurrió a los criterios de presencia y/o ausencia de ácidos grasos, mencionados anteriormente.

Con esto se observa que, en el fragmento del fogón 1*, la proporción de ácido palmítico/ácido esteárico, fue de 1.45, lo cual indicaría que los residuos de ácidos grasos presentes corresponden a una fuente de origen vegetal. Por otro lado, la presencia de ácidos grasos insaturados es poca, por lo que se debe tener en cuenta que las proporciones de los ácidos grasos cambiaron como producto de la posible descomposición después de 30 siglos de intemperie.

Malainey (2007) realizó un estudio para conocer el grado de descomposición de los ácidos grasos a largo plazo y para identificar proporciones de ácidos grasos estables, encontrando que la relación de los isómeros de C18:1 y ácido oleico, no cambian aunque exista degradación de estos, por lo que es posible usar esta relación para identificar residuos en muestras arqueológicas. En dicha investigación también fue posible determinar que la presencia de ácidos grasos de cadena media (C12:0, C14:0 y C15:0), indican que las muestras han sufrido degradación lipídica. En la Tabla 10 se aprecia que estos ácidos grasos se encontraron presentes en las muestras de los fogones en estudio, lo que indica que

sí hay altas probabilidades de que se tuviera una degradación; ya que ácidos grasos de cadena impar como el ácido pentadecanoico tienden a ser subproductos de la degradación (Reber y Evershed, 2006).

2) FOGÓN 1 Y SU COMPARACIÓN CON LA CARNE DE ARMADILLO (*Dasypus novemcinctus*) Y VENADO (*Odocoileus virginianus*)

En el fragmento perteneciente a otra pared de la estructura del fogón 1 los únicos ácidos grasos que se encontraron fueron: el ácido palmítico (23.27%), el ácido esteárico (13.51%) y el ácido mirístico (1.05%). Los tres ácidos grasos encontrados también están presentes en las muestras de carne de armadillo y venado. Como se muestra en la Tabla 10, en esta parte del fogón solamente se tiene la presencia ácidos grasos saturados, sugiriendo una degradación en los ácidos grasos insaturados, anteriormente mencionada en el fogón 1. Además, la proporción de ácido palmítico/ácido esteárico, fue de 1.72, lo cual indicaría que los residuos de ácidos grasos presentes corresponden también a una fuente de origen vegetal. Pero, en esta muestra se logró la identificación de la presencia de colesterol, la cual indica que el alimento cocinado en él era de origen animal. Debido a que no se identificaron más ácidos grasos y a que los perfiles lipídicos de la carne de armadillo y venado tienen similitudes con el perfil del fogón 1, no es posible definir con este fragmento el tipo de carne que pudiera haber estado presente.

3) FOGÓN 2 Y SU COMPARACIÓN CON LA CARNE DE ARMADILLO (*Dasypus novemcinctus*) Y VENADO (*Odocoileus virginianus*)

En el fragmento perteneciente al centro de la estructura del fogón 2 los ácidos grasos que se encontraron en mayor proporción fueron: el ácido palmítico (28.22%), el ácido esteárico (18.05%) y el ácido pentadecanoico (16.53%). Comparando con la muestra de armadillo, los ácidos grasos encontrados en común fueron los ácidos: decanoico, mirístico, pentadecanoico, palmítico, 11-octadecanoico, esteárico, araquídico, behénico y lignocérico. Al comparar con las muestras de venado, los ácidos grasos encontrados en común fueron los ácidos: mirístico, palmítico, esteárico, araquídico y behénico. En la Tabla 10 se observa

una mayor presencia de ácidos grasos saturados que de insaturados. Por otra parte, se observa nuevamente que el armadillo mostró una mayor presencia de ácidos grasos en común con la muestra del fogón 2 que con las muestras de venado. Además, se logró la identificación de colesterol, indicando la presencia de alimentos de origen animal, que debieron ser de los alimentos que se consumían en San Lorenzo, Veracruz, México. La proporción de ácido palmítico/ácido esteárico, fue de 1.56, indicando nuevamente que los residuos de ácidos grasos correspondientes a una fuente de origen vegetal.

4) FOGONES 1*, 1 y 2 Y SU COMPARACIÓN CON LA CARNE DE ARMADILLO (*Dasypus novemcinctus*) Y VENADO (*Odocoileus virginianus*)

Malainey (2007) realizó un estudio para conocer el grado de descomposición de los ácidos grasos a largo plazo y para identificar proporciones de ácidos grasos estables, encontrando que la relación de los isómeros de C18:1 y ácido oleico, no cambian aunque exista degradación de estos, por lo que es posible usar esta relación para identificar residuos en muestras arqueológicas. En dicha investigación también fue posible determinar que la presencia de ácidos grasos de cadena media (C12:0, C14:0 y C15:0), indican que las muestras han sufrido degradación lipídica. En la Tabla 10 se aprecia que estos ácidos grasos se encontraron presentes en la muestra de cada fogón, lo que indica que sí existen altas probabilidades de que se presentara una degradación; ya que ácidos grasos de cadena impar como el ácido pentadecanoico tienden a ser subproductos de la degradación (Reber y Evershed, 2006). Además, derivado de este trabajo, se constató que la relación de los isómeros de C18:1, ácido oleico, no cambiaron con la descomposición, por lo que la presencia de estos compuestos en el fogón 2 indican que contuvo muestras de origen animal. Por otro lado, se observa que estos isómeros fueron comunes en las muestras del fogón 1, de armadillo y de venado, por lo cual se cuenta con dos parámetros, uno que indica la presencia de carne y otro que indica que los ácidos grasos son de una fuente vegetal. Esto se podría explicar dado que el contenido de ácido palmítico en el fogón es uno de los ácidos grasos comunes de la palma la cual como se mencionó arriba probablemente se empleaba como combustible en la preparación de los alimentos (ahumado), tal y como se encontró en

el análisis de fitolitos del grupo de la Dra. Ann Cyphers (Cyphers y col., 2013). Además, se encontró la presencia de estigmasterol característico de las plantas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Dados los resultados arrojados en estos experimentos y con base en los objetivos planteados al principio de la investigación, los cuales eran: 1) Extraer ácidos grasos (a partir de los esteres metílicos) y esteroides (principalmente el colesterol) de los restos de los fogones con aproximadamente 3000 años de antigüedad para su posterior caracterización por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas 2) Establecer una metodología para la determinación de esteroides para las muestras arqueológicas a analizar, con modificaciones las normas mexicanas NMX-F-089-S-1978 (DOF, 1978) y NMX-K-306-SCFI-2006 (DOF, 2006), 3) Obtener los ácidos grasos en muestras biológicas (muestras de venado (*Mazama americana*) y de armadillo (*Dasypus novemcinctus*) y en muestras arqueológicas (fogones) con modificación a las normas mexicanas NMX-F-089-S-1978 (DOF, 1978) y NMX-F-017-SCFI-2011 (DOF, 2011), 4) Comparar los resultados obtenidos de los ácidos grasos y esteroides (colesterol) del fogón con el análisis del contenido de lípidos de 2 especies animales típicas de la zona: venado y armadillo y, finalmente, 5) Comparar los resultados obtenidos en el análisis de los ácidos grasos contenidos en el fogón con los criterios de identificación de residuos de alimentos en fragmentos arqueológicos citados en la literatura, es posible concluir lo siguiente:

- Fue posible la determinación de los ácidos grasos en las muestras biológicas (armadillo y venado) y en muestras arqueológicas, con modificaciones a las normas mexicanas mencionadas arriba para utilizar reactivos menos dañinos con el ambiente.
- La metodología para la determinación de los esteroides para materiales cerámicos y muestras arqueológicas se realizó con base en las normas mexicanas también

mencionadas arriba disminuyendo el tiempo de análisis de las muestras (tradicionalmente de 1 h por muestra a 20 minutos por muestra).

- Por medio de la reacción de derivatización empleando HCl al 5% en metanol se evitó la utilización de compuestos de silanización y también de tiempos largos de análisis, obteniendo en las muestras de ollas de barro, oxiesteroles, mientras que en las muestras arqueológicas únicamente se obtuvieron esteroides en su forma libre (colesterol y estigmasterol) indicando el primero la presencia de alimentos de origen animal y el segundo el uso de la palma como combustible.
- Fue posible la identificación de los ésteres metílicos de la carne de armadillo y de venado, encontrándose en mayor abundancia el ácido oleico (27.05%), el isómero del ácido oleico (17.19%) y el isómero del ácido linoleico (10.88%) para el caso del armadillo y el ácido palmítico (23.64%), el ácido oleico (14.25%) y el ácido esteárico (8.48%) para el venado.
- De las 2 carnes evaluadas, se observó una mayor similitud de los ésteres metílicos de la carne de armadillo con los restos de los fogones que con la de venado, encontrándose 17 ésteres metílicos similares que fueron los siguientes: los ácidos pelargónico, cáprico, tridecanoico, mirístico, 9-metiltetradecanoico, pentadecanoico, palmitoleico, palmítico, margárico, oleico, isómeros del ácido oleico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido tricosanoico y, finalmente, el tetracosanoico. Por otro lado, al comparar con las muestras de venado los ácidos grasos encontrados en común fueron el ácido tridecanoico, mirístico, 9-metiltetradecanoico, palmítico, margárico, linoleico, oleico, ácido esteárico, araquídico y behénico.
- En el primer fogón (1*) se realizó una comparación de proporciones entre el ácido palmítico/ácido esteárico, siendo de 1.45. En la muestra de fogón 1, fue de 1.72 y en la muestra del fogón 2 de 1.56. De acuerdo con la investigación de Reber y Evershed (2006), indican que los ácidos presentes sean de origen vegetal, probablemente de la palma que era utilizada como combustible.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir estudiando las muestras de otras partes de otros fragmentos de fogón para poder corroborar los resultados obtenidos en esta investigación, realizando la comparación con otras muestras biológicas de origen animal (posiblemente camarón de río) de la región de San Lorenzo.
- Debido a que en los estudios arqueológicos se requiere del análisis de un gran número de muestras es recomendable evaluar la posibilidad de utilizar otro método de extracción más rápido que el método Soxhlet, como sería la extracción por ultrasonido.
- Por otro lado, dado que únicamente en las muestras arqueológicas se encontraron esteroides libres es recomendable realizar la identificación de los compuestos lo más rápido posible utilizando otros métodos de derivatización más expeditos y que permitan preservar la muestra para su análisis posterior.

ANEXO A
CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASAS DE LAS MUESTRAS
ANALIZADAS

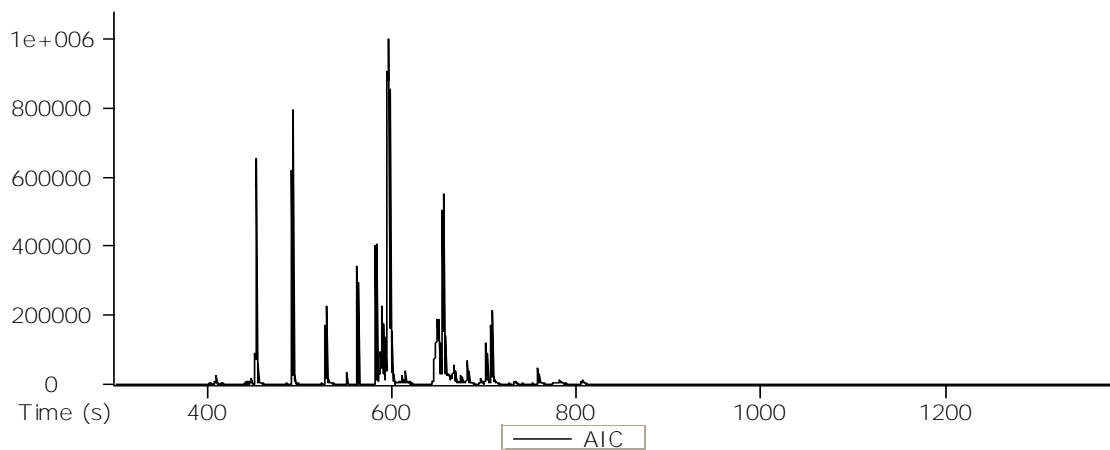


Figura 1A. Cromatograma de la muestra 1 de carne de armadillo

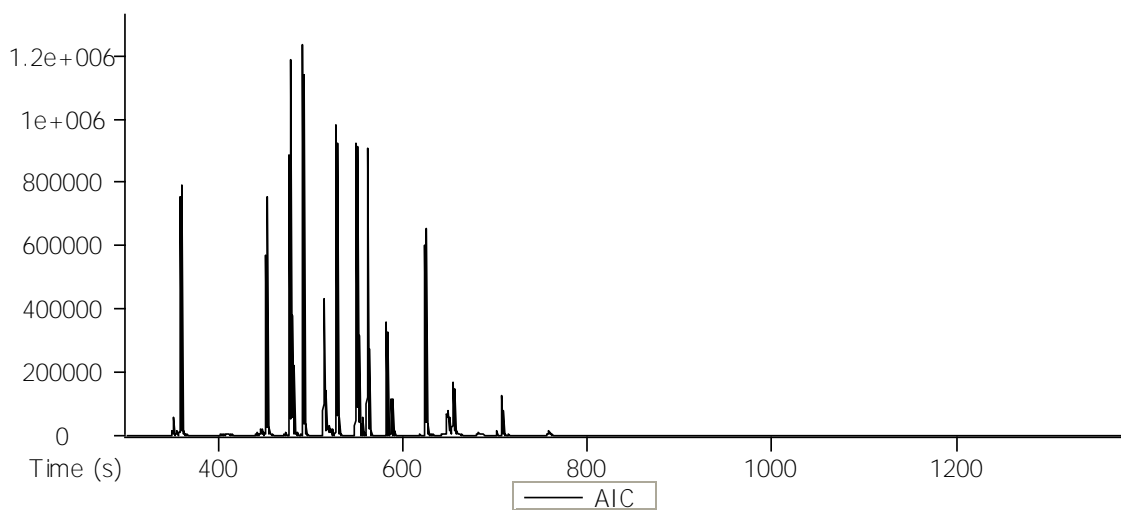


Figura 2A. Cromatograma de la muestra 2 de carne de armadillo

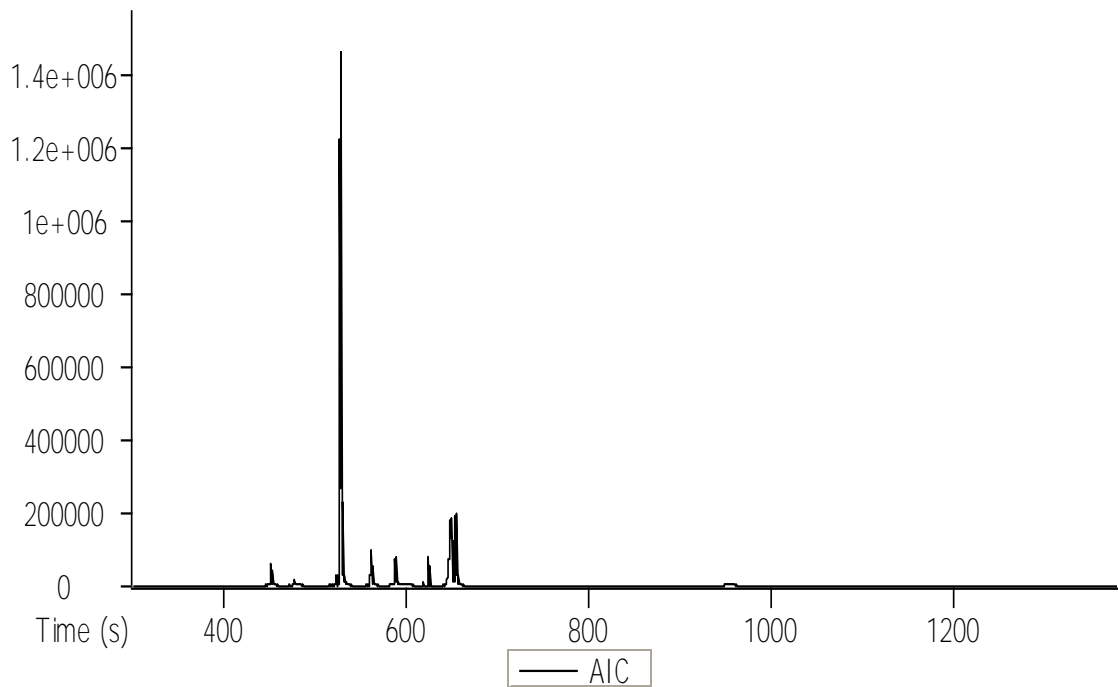


Figura 3A. Cromatograma de la muestra 1 de carne de venado

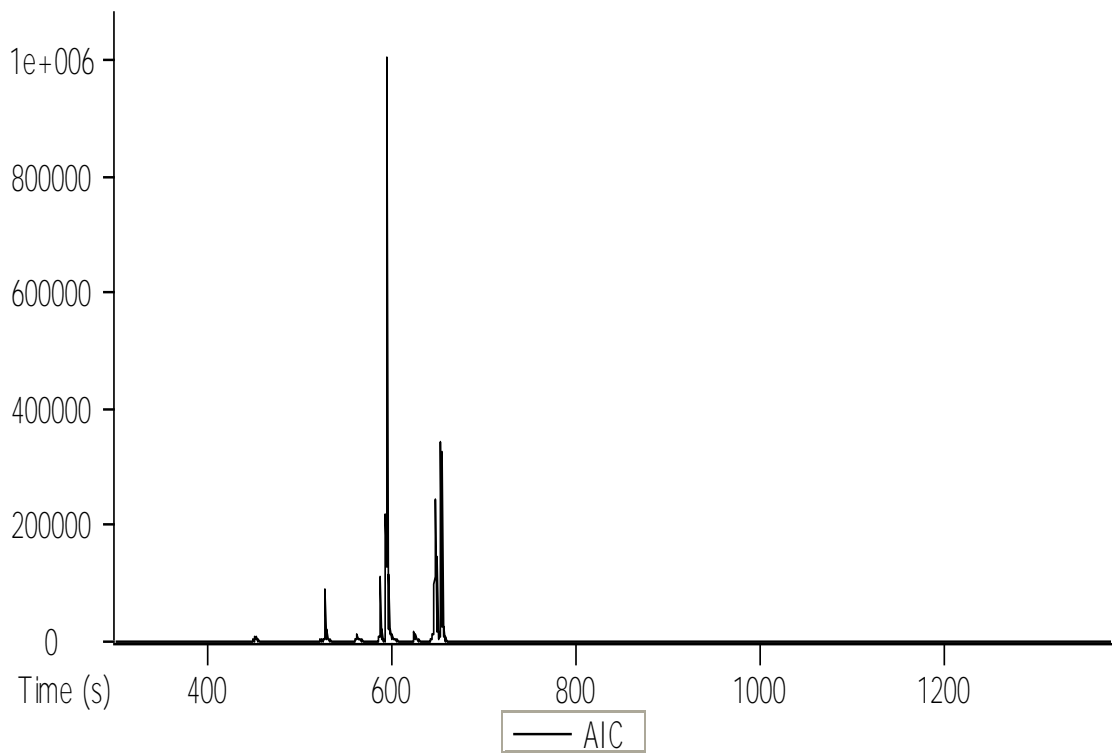


Figura 4A. Cromatograma de la muestra 2 de carne de venado

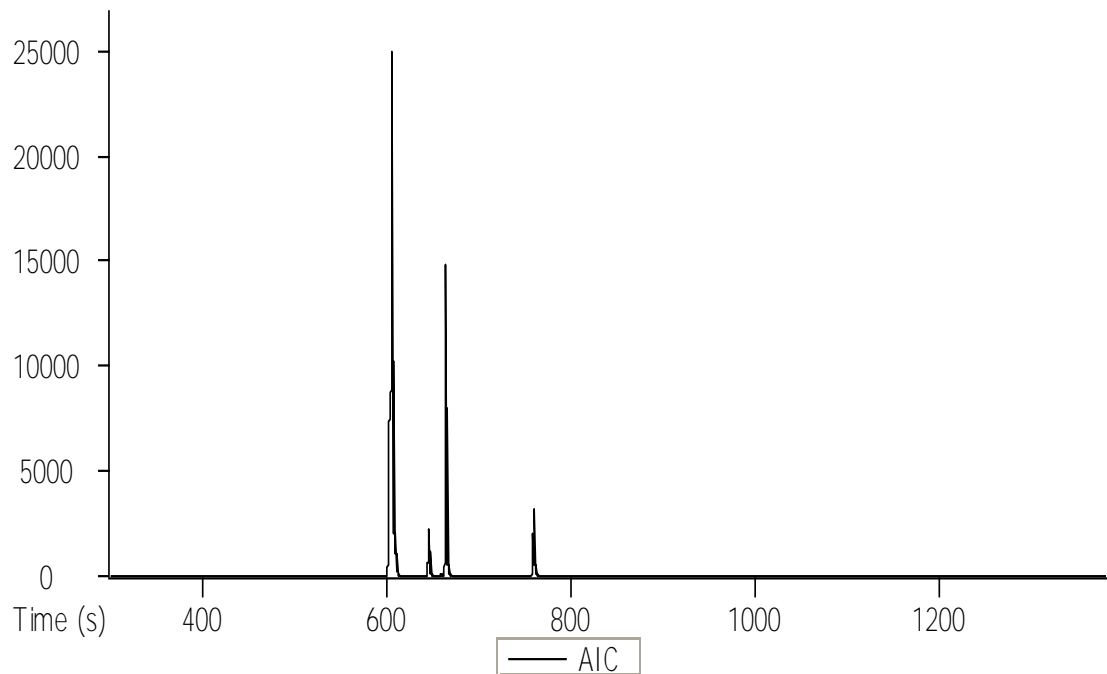


Figura 5A. Cromatograma de la muestra 2 de las ollas con exudados de la carne de armadillo

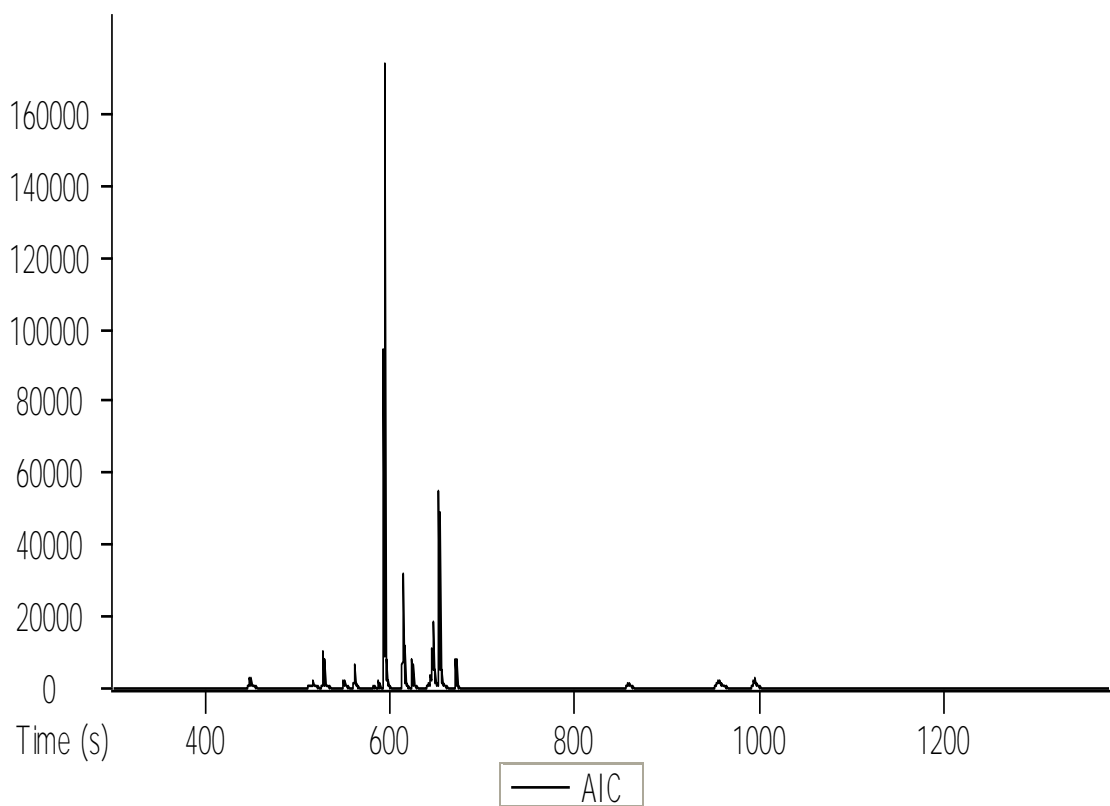


Figura 6A. Cromatograma de la muestra 2 de las ollas con exudados de la carne de venado

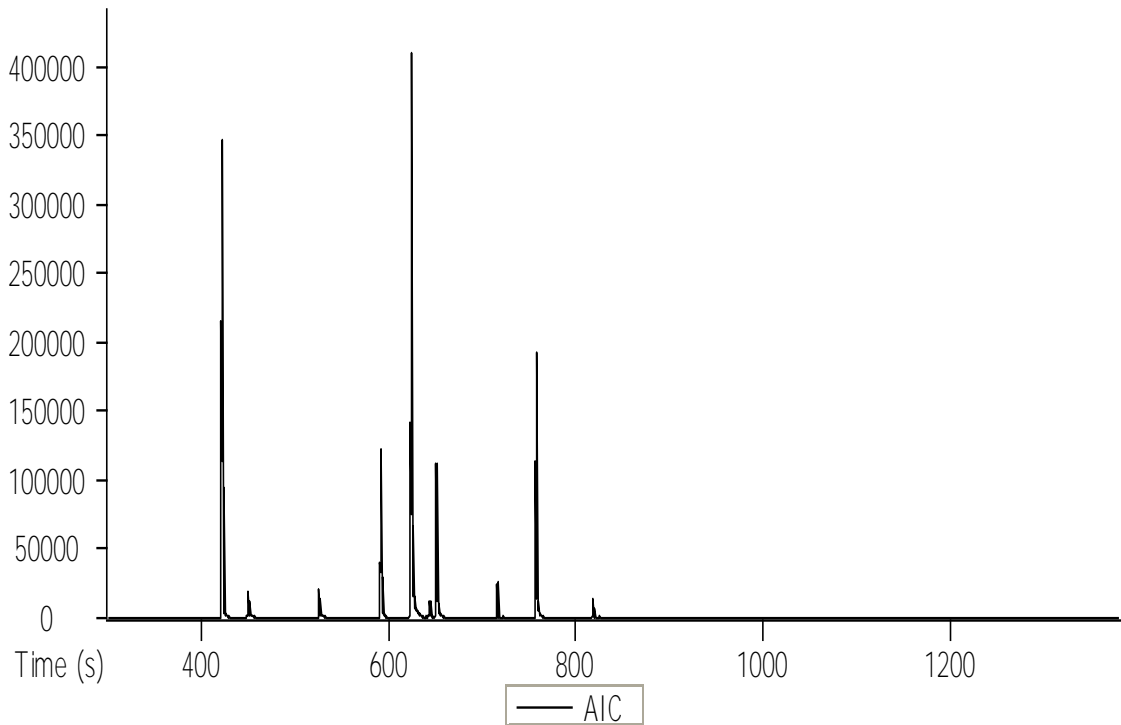


Figura 7A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FD) para la determinación de ácidos grasos

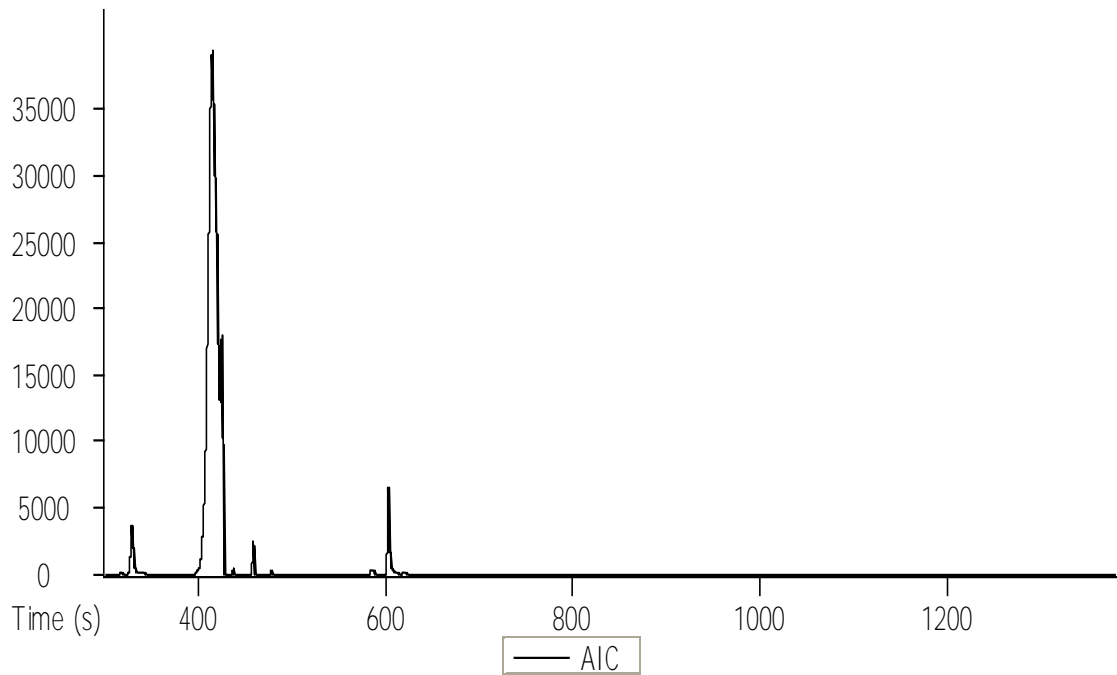


Figura 8A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FD) para la determinación de ácidos grasos

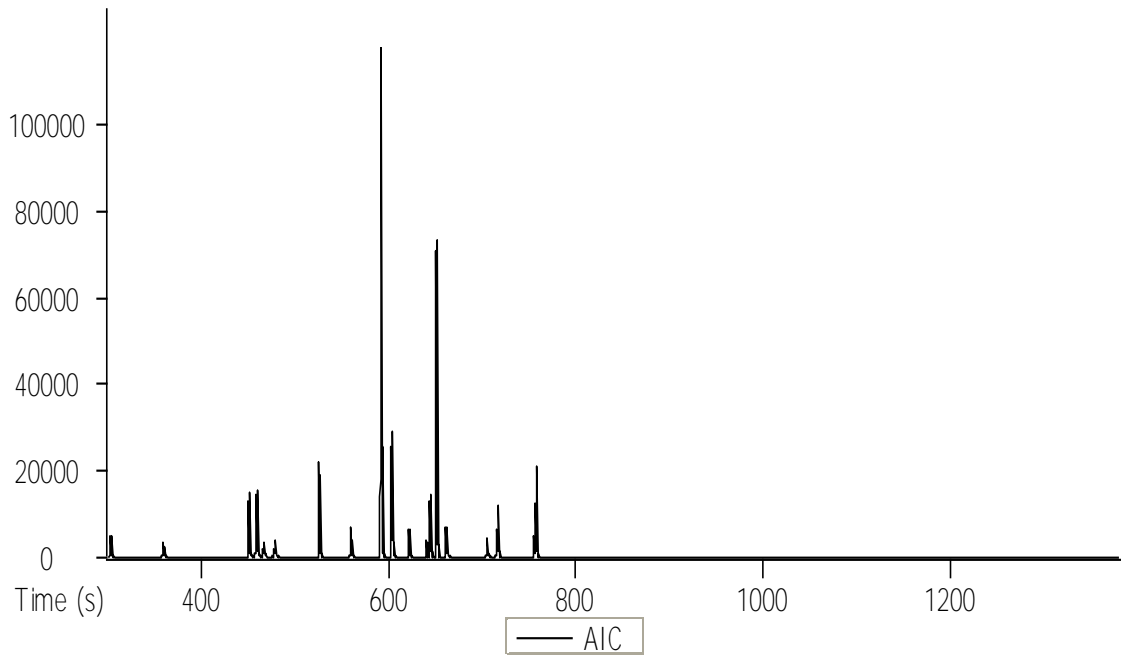


Figura 9A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FI) para la determinación de ácidos grasos

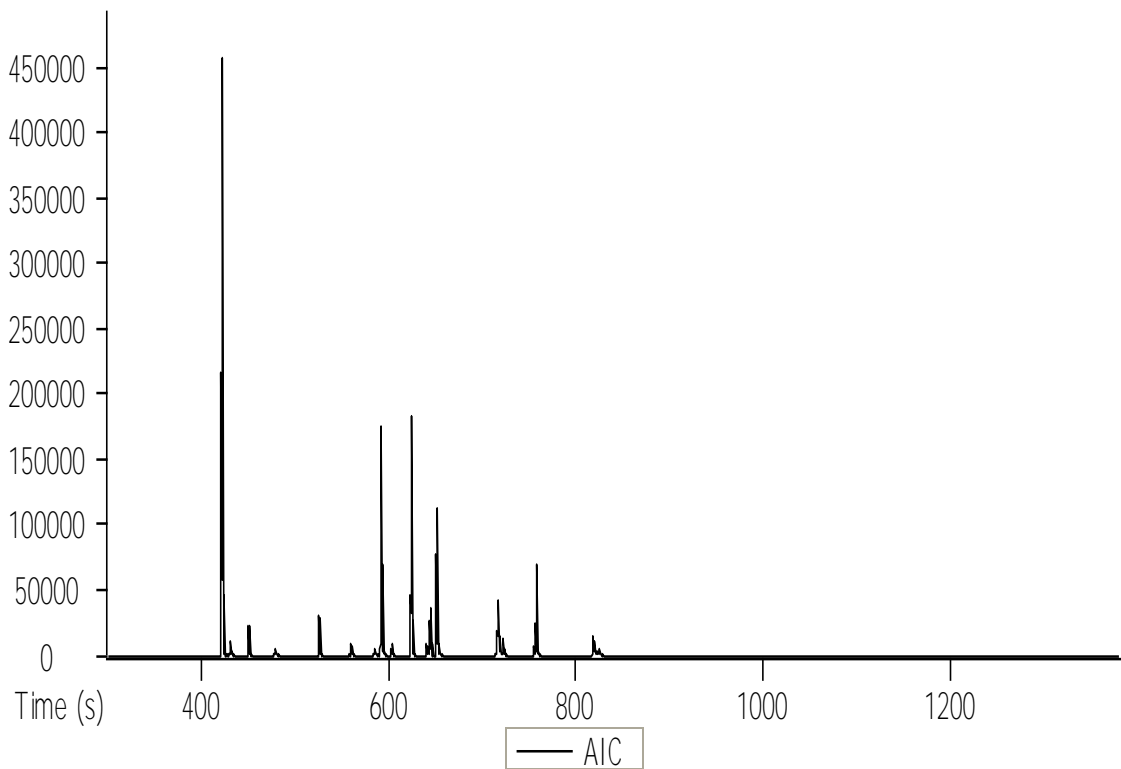


Figura 10A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FI) para la determinación de ácidos grasos

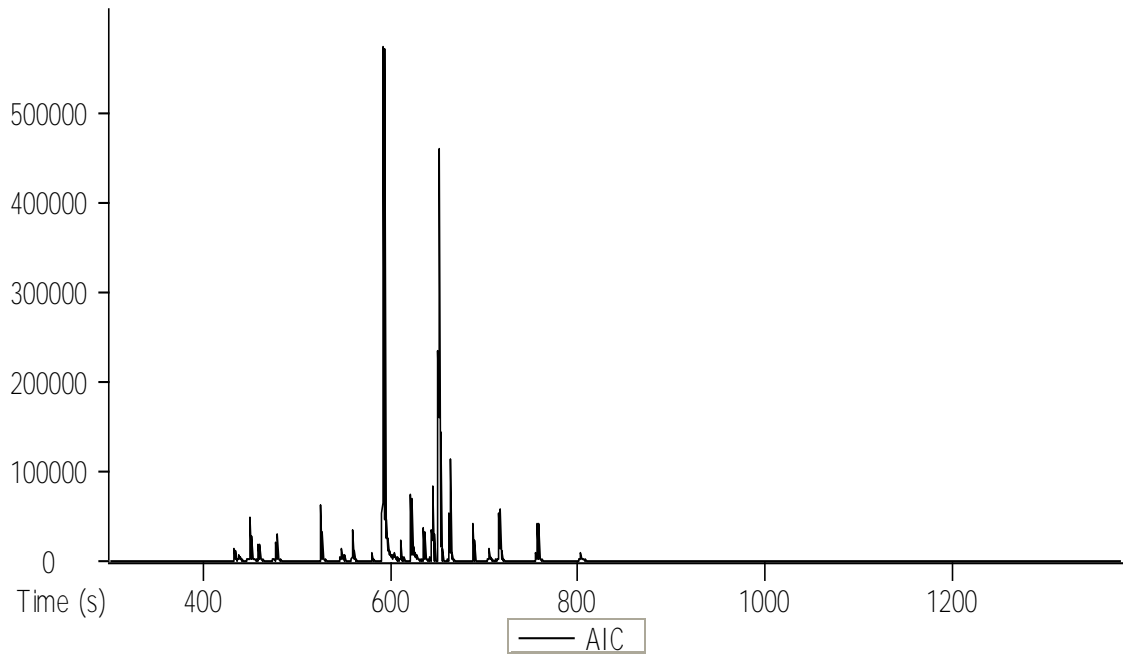


Figura 11A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FA) para la determinación de ácidos grasos

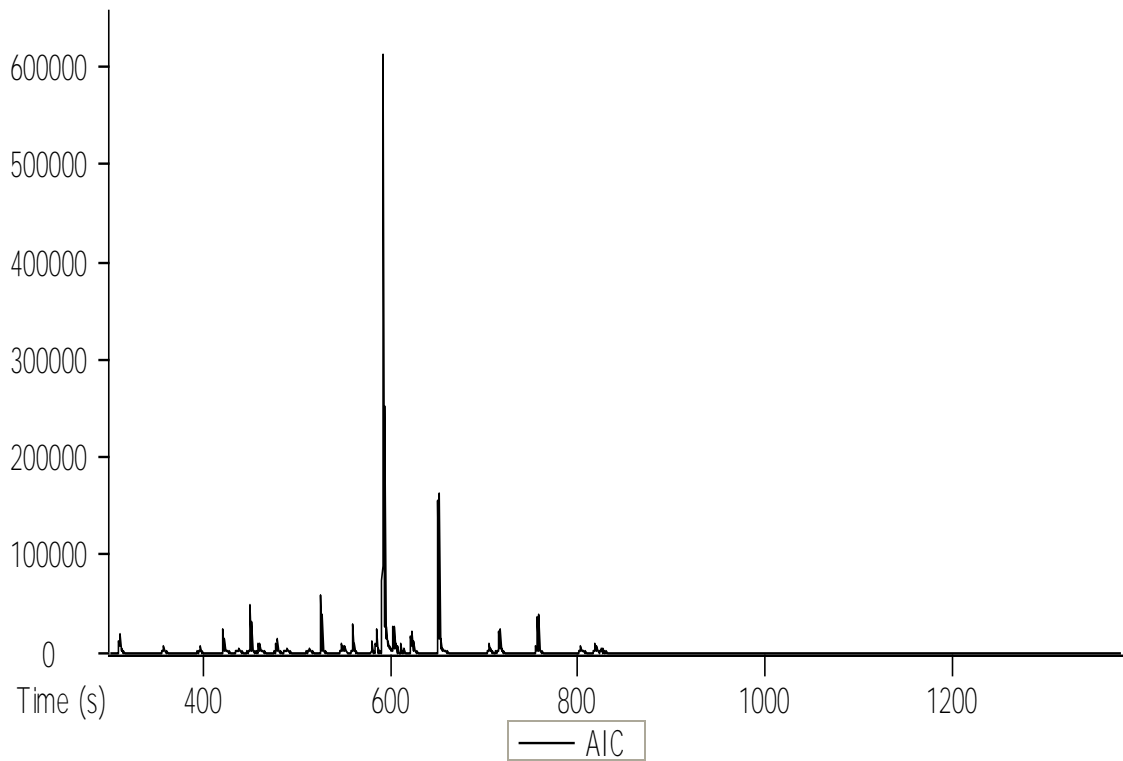


Figura 12A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FA) para la determinación de ácidos grasos

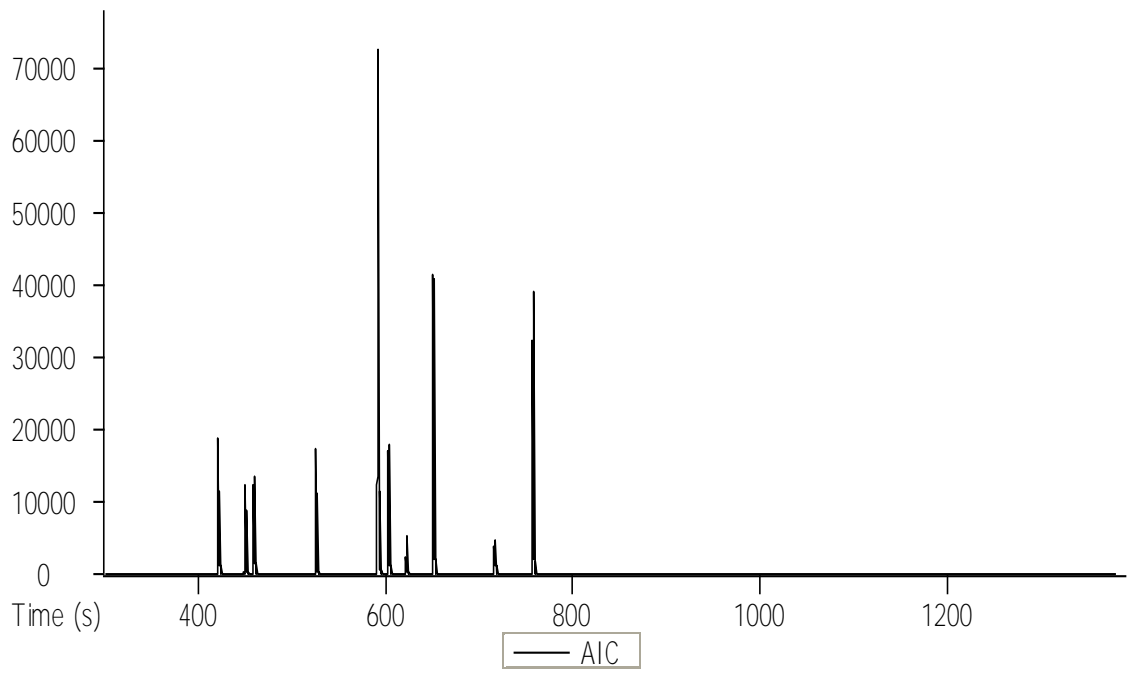


Figura 13A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FE) para la determinación de ácidos grasos

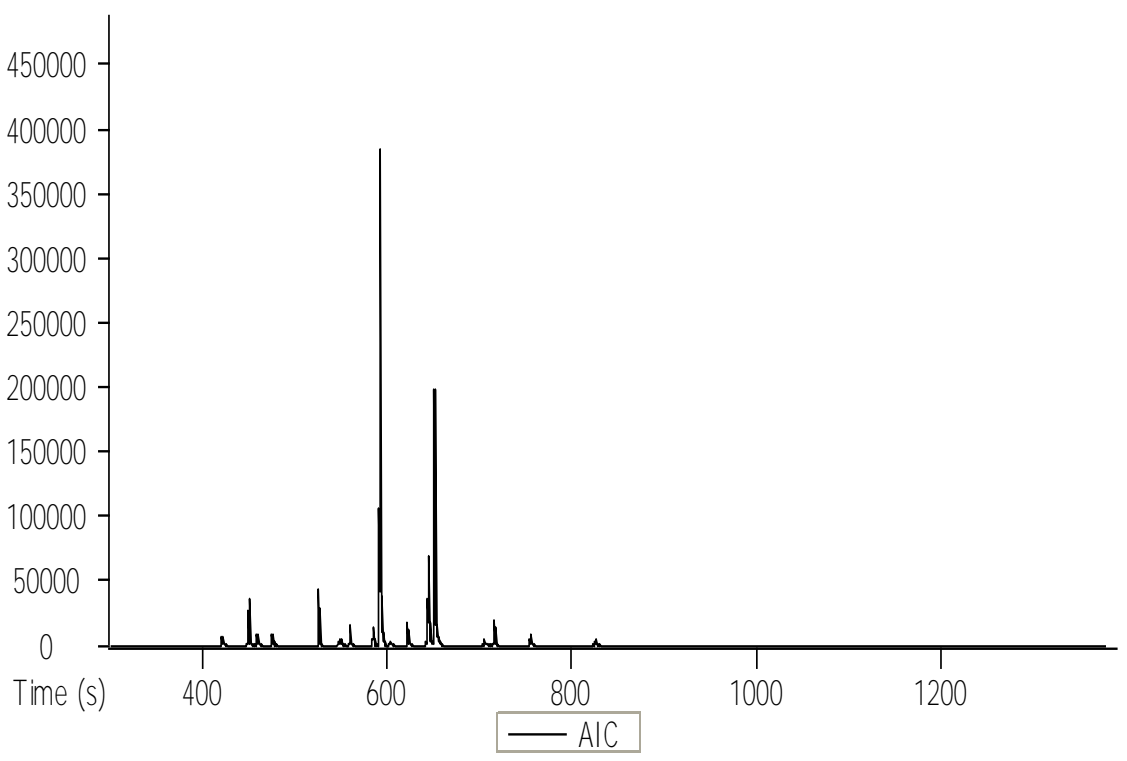


Figura 14A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FE) para la determinación de ácidos grasos

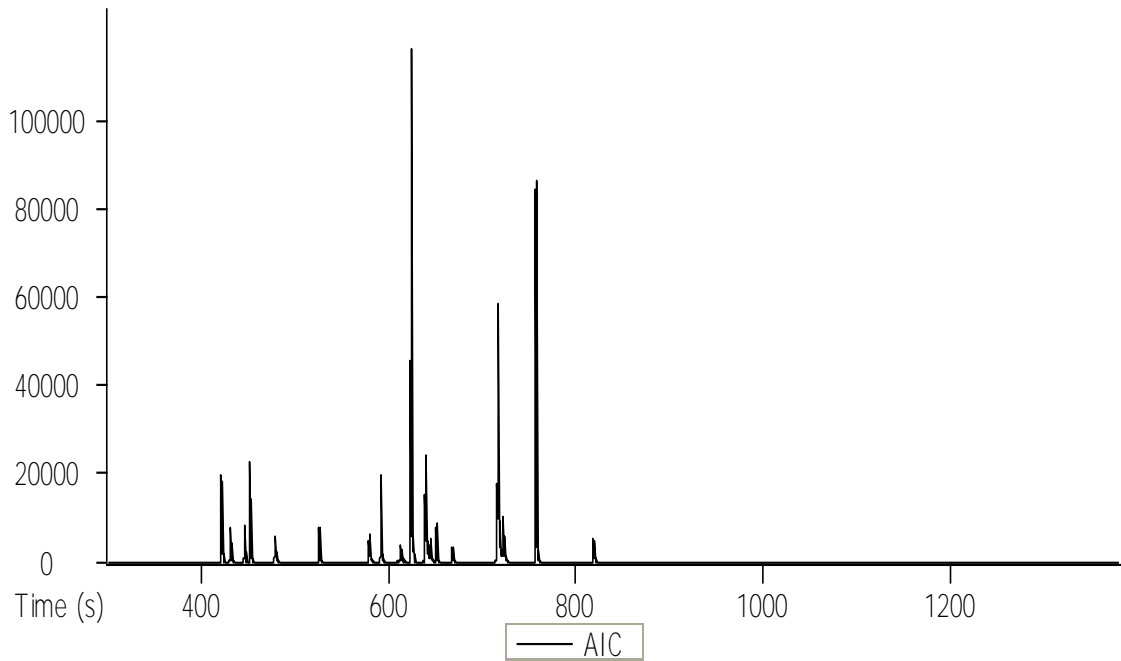


Figura 15A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FD) para la determinación de esteroides

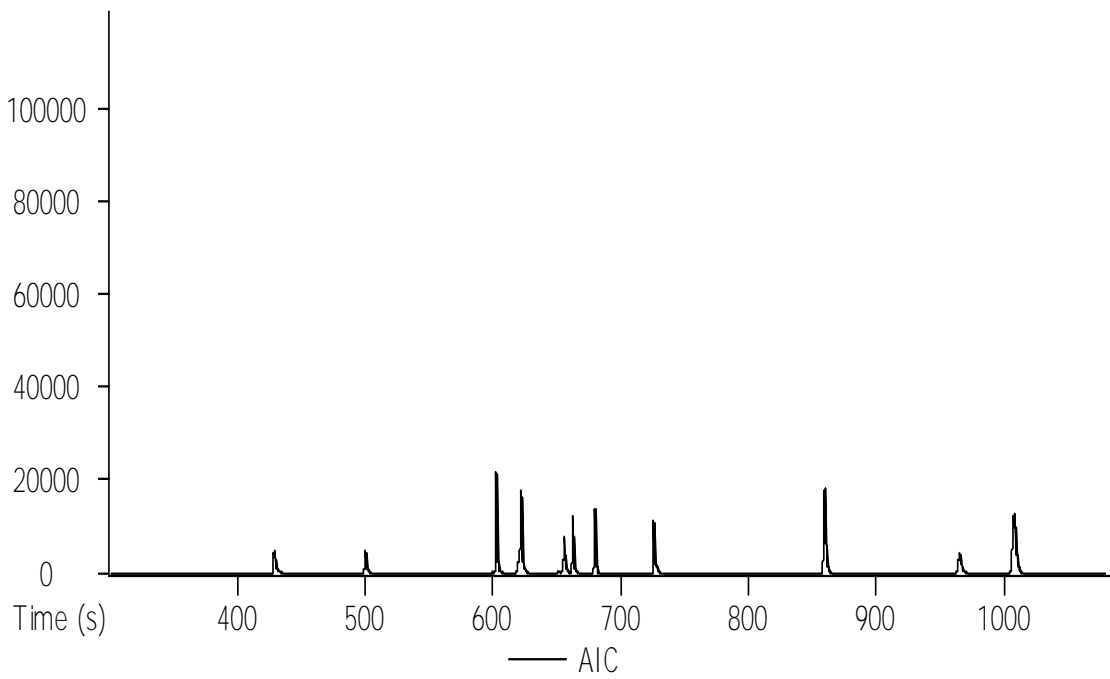


Figura 16A. Cromatograma de la muestra 2 fogón 1(FD) para la determinación de esteroides

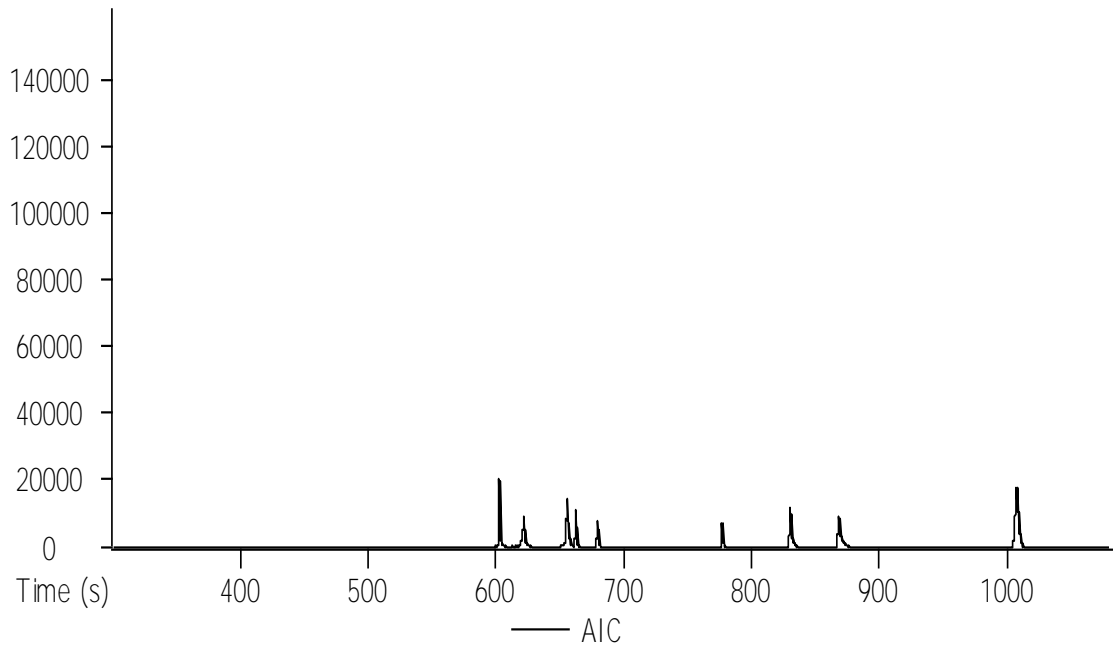


Figura 17A. Cromatograma de la muestra 3 de fogón 1(FD) para la determinación de esteroides

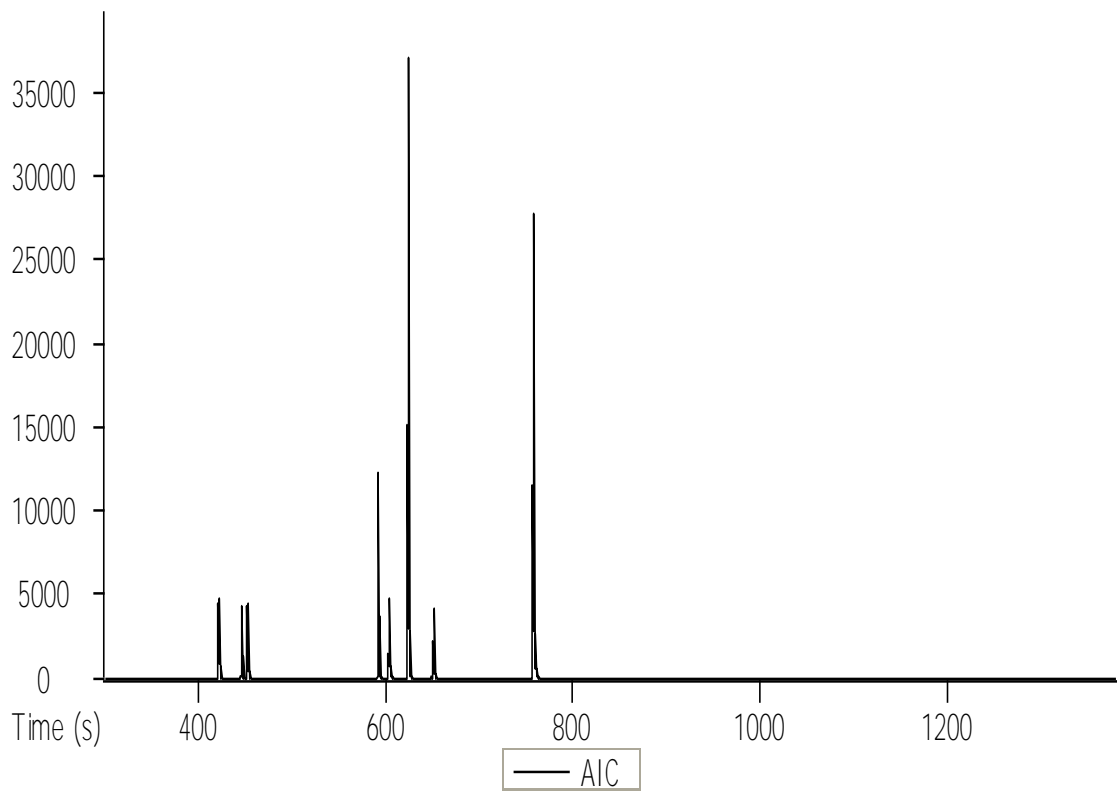


Figura 18A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FI) para la determinación de esteroides

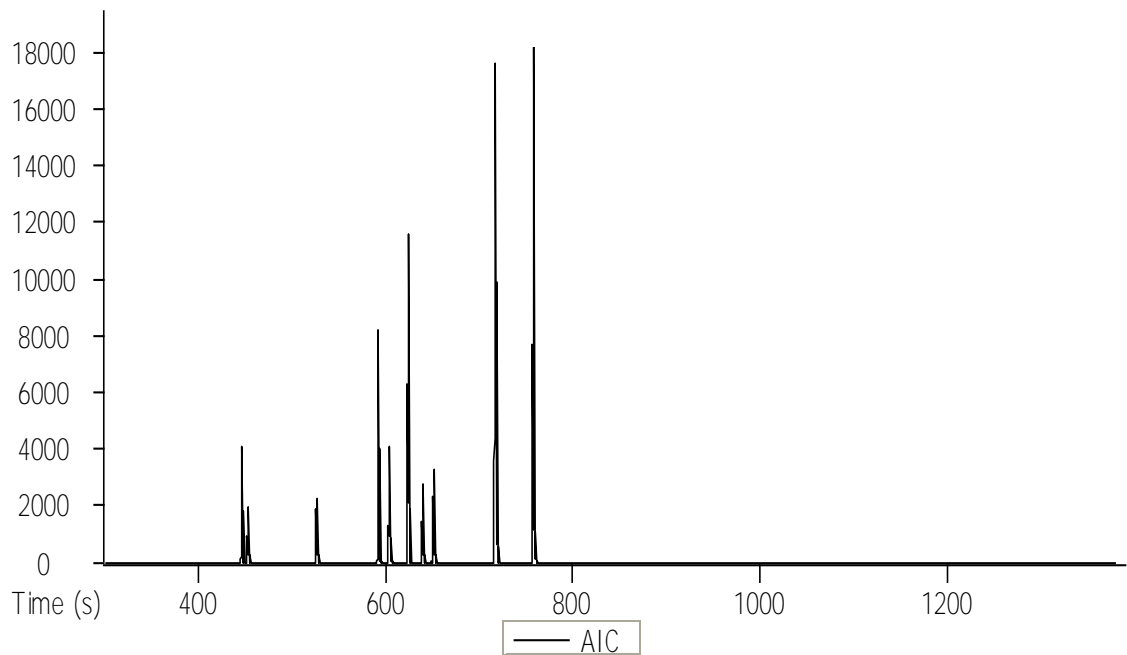


Figura 19A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FI) para la determinación de esteroides

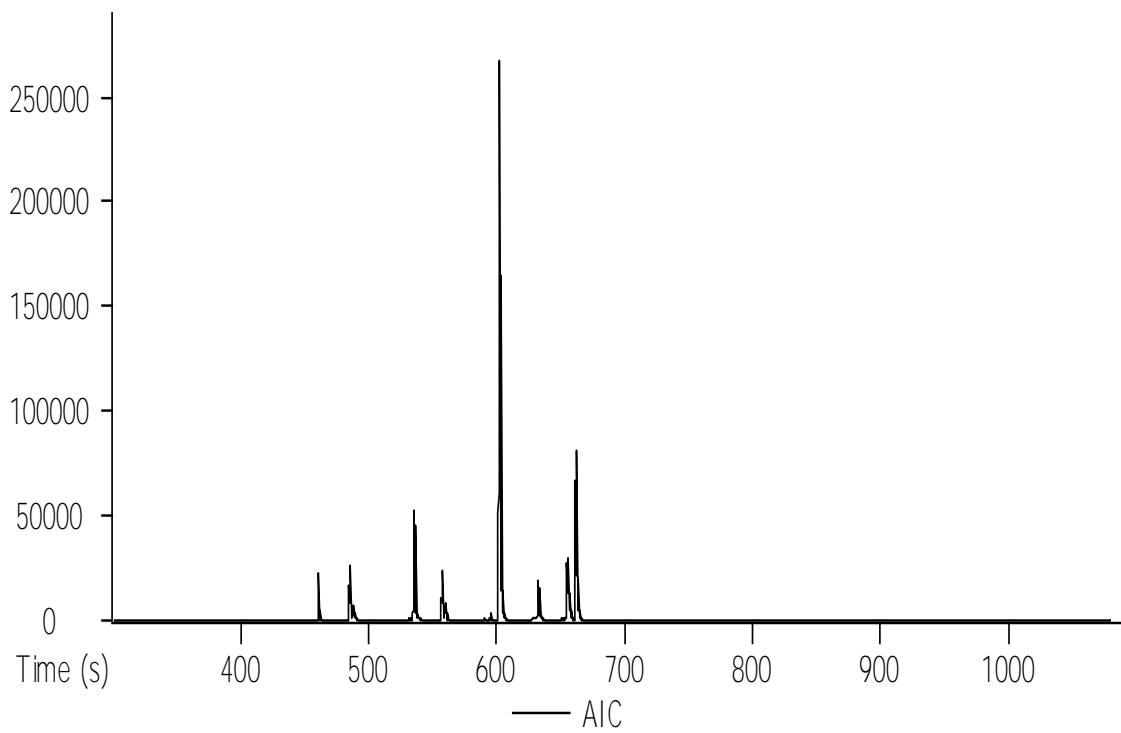


Figura 20A. Cromatograma de la muestra 3 de fogón 1(FI) para la determinación de esteroides

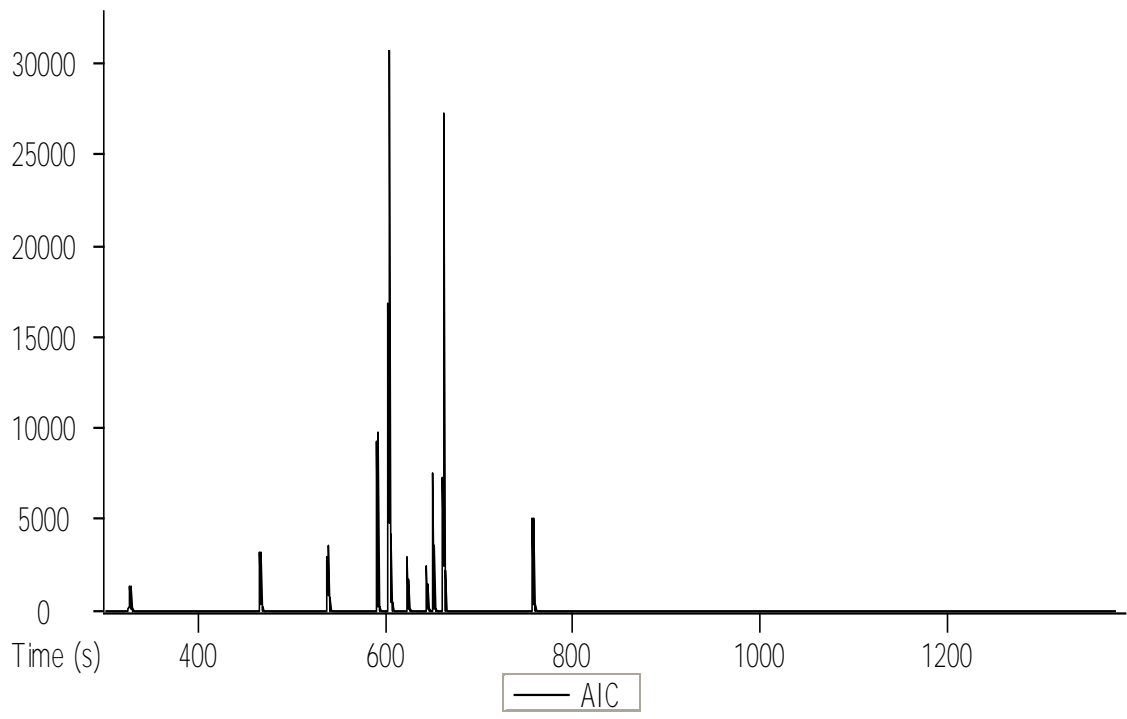


Figura 21A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FA) para la determinación de esteroides

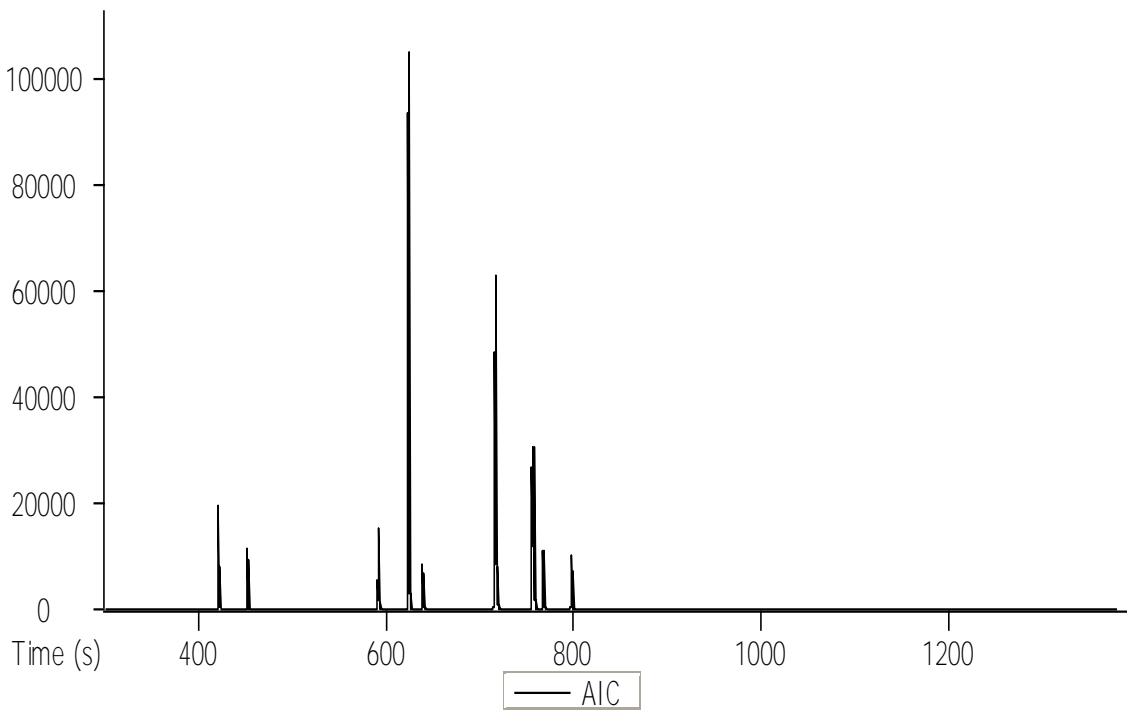


Figura 22A. Cromatograma de la muestra 2 fogón 1(FA) para la determinación de esteroides

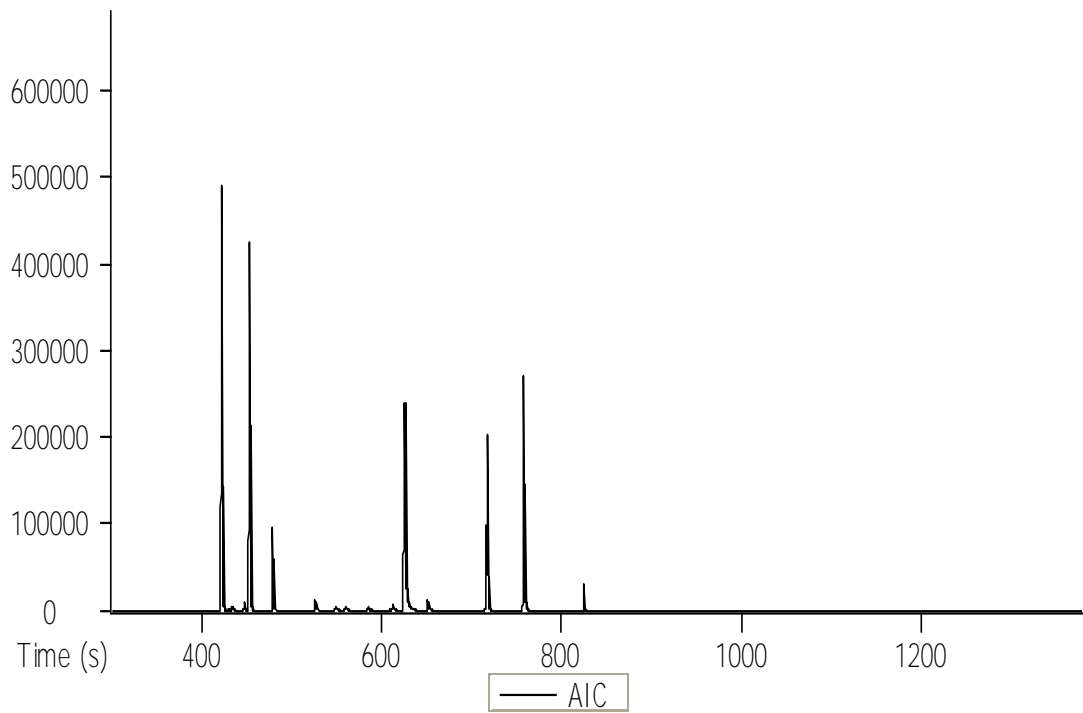


Figura 23A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1(FE) para la determinación de esteroides

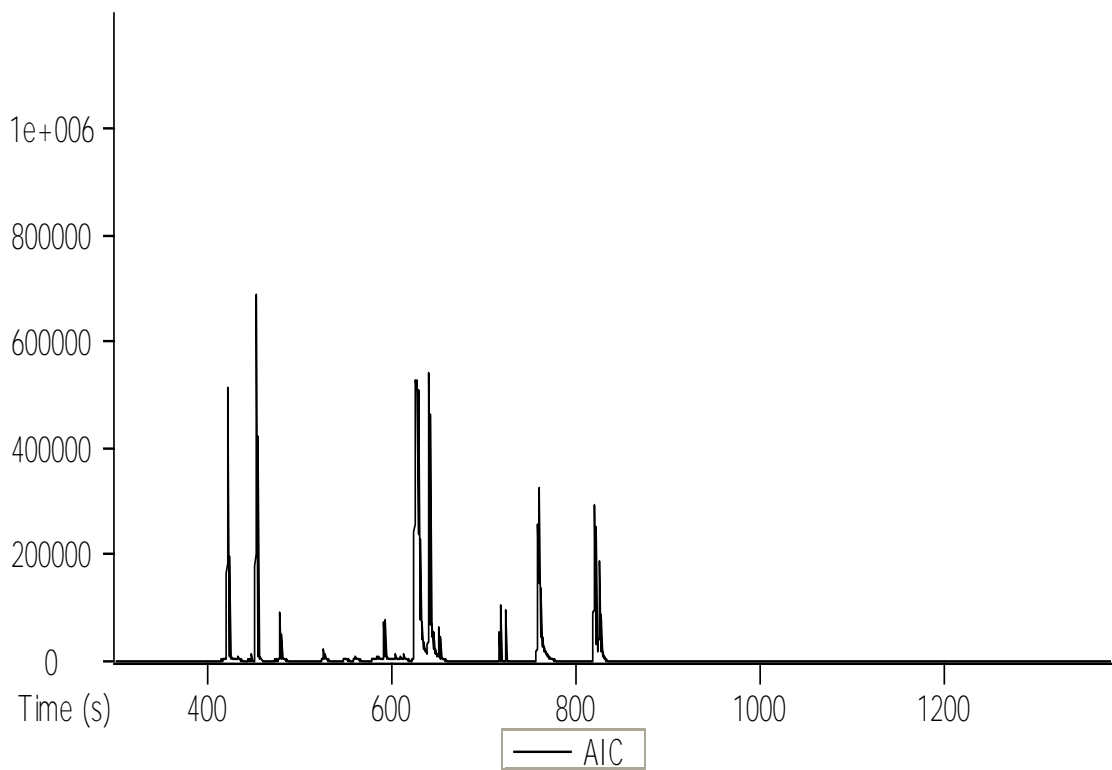


Figura 24A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1(FE) para la determinación de esteroides

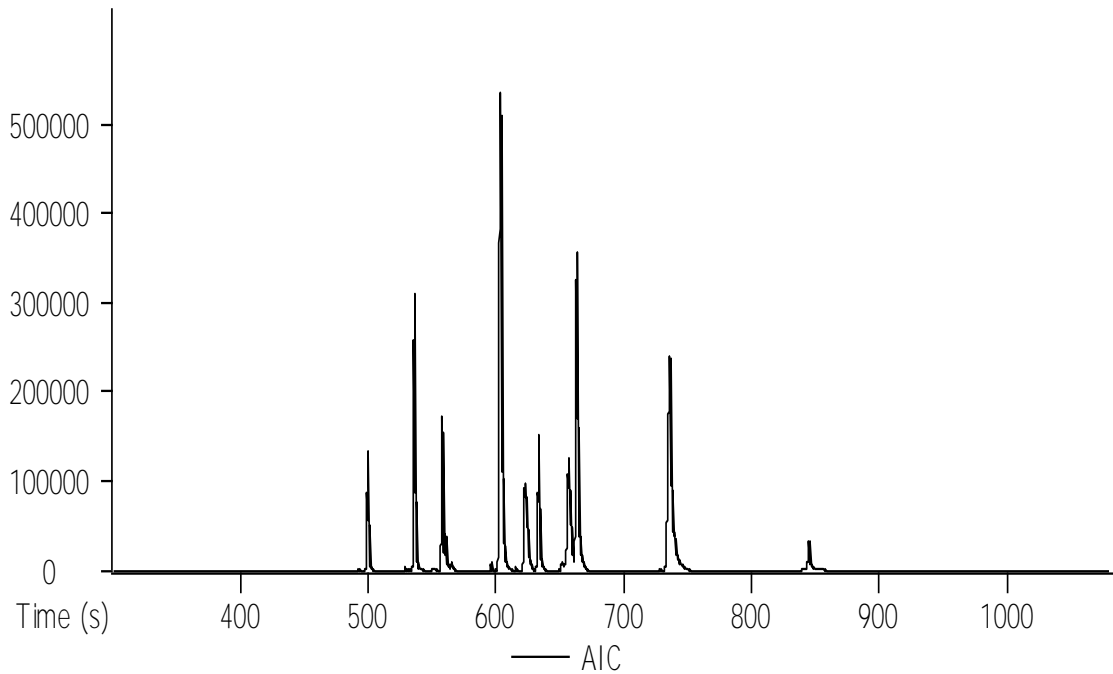


Figura 25A. Cromatograma de la muestra 3 de fogón 1(FE) para la determinación de esteroides

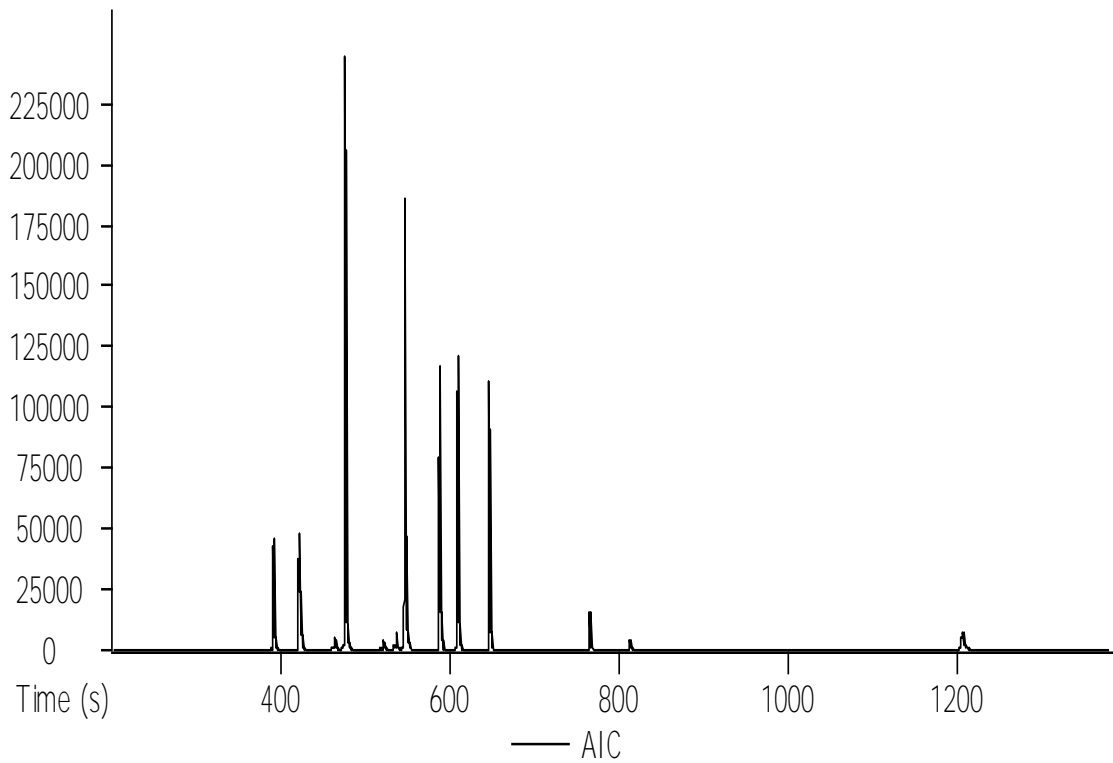


Figura 26A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 1 para la determinación de los ácidos grasos

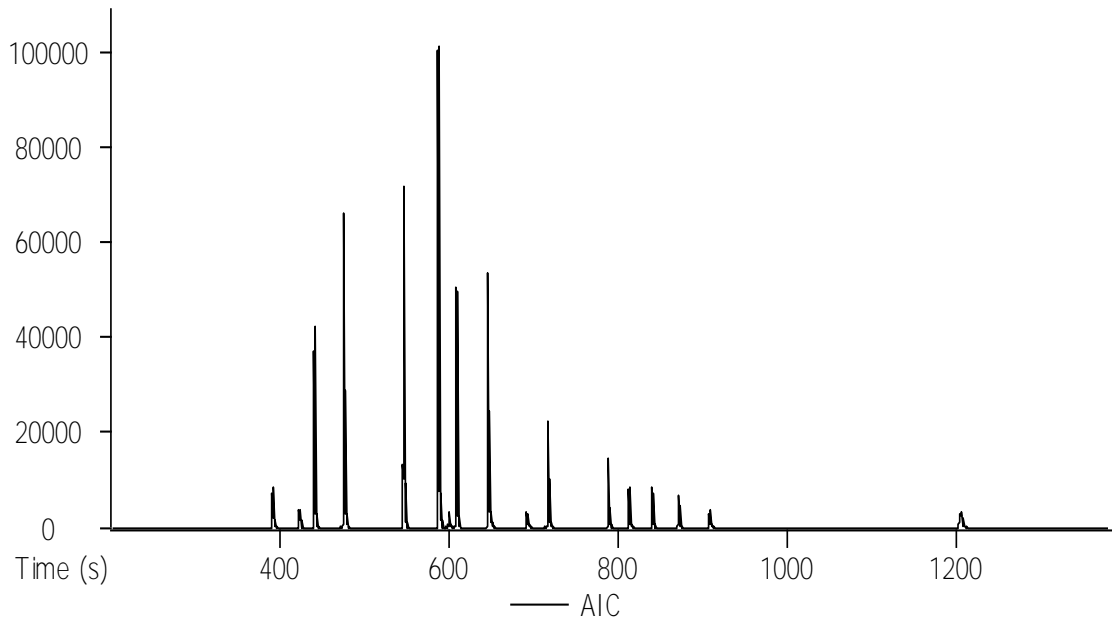


Figura 27A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 1 para la determinación de los ácidos grasos

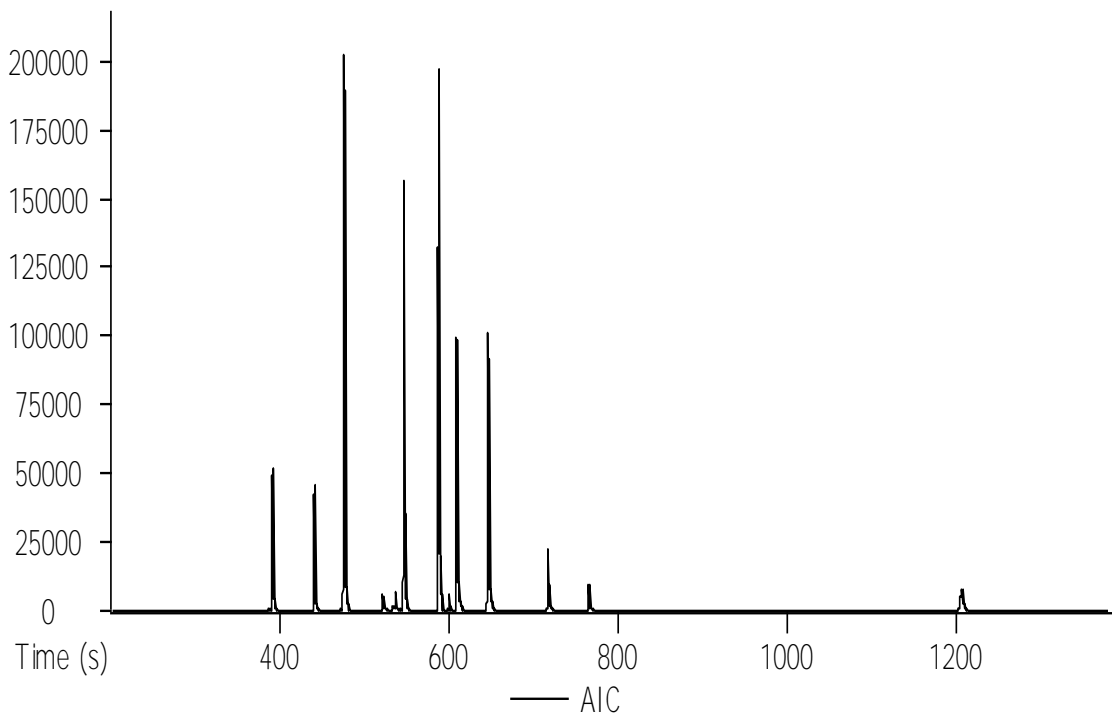


Figura 28A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 2 "fondo" para la determinación de los ácidos grasos

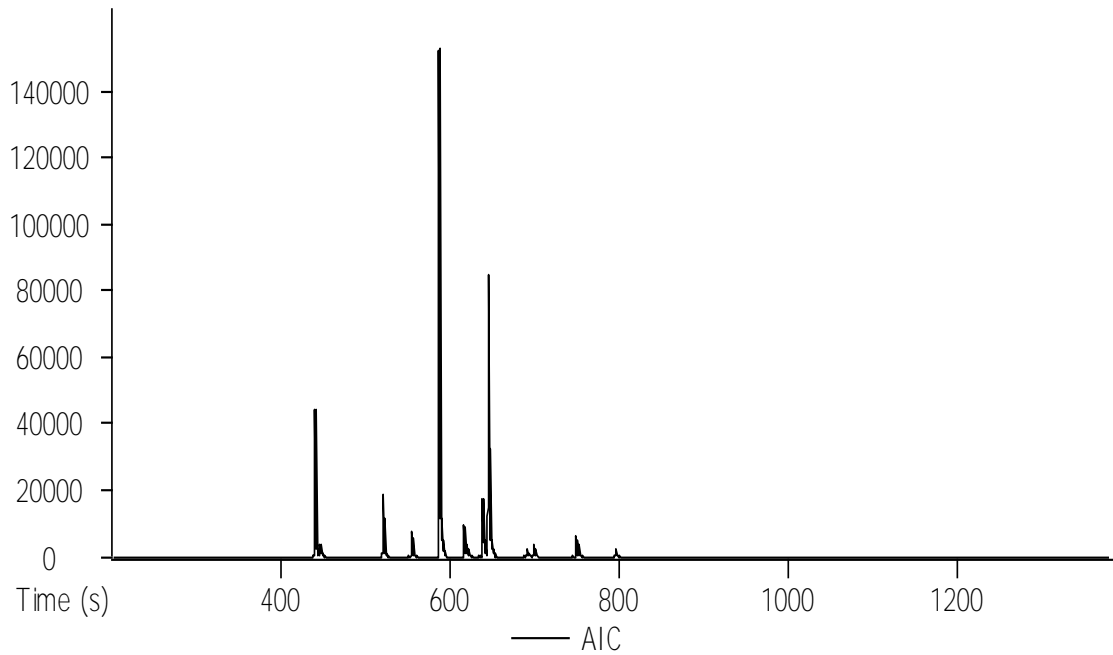


Figura 29A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 2 “fondo” para la determinación de los ácidos grasos

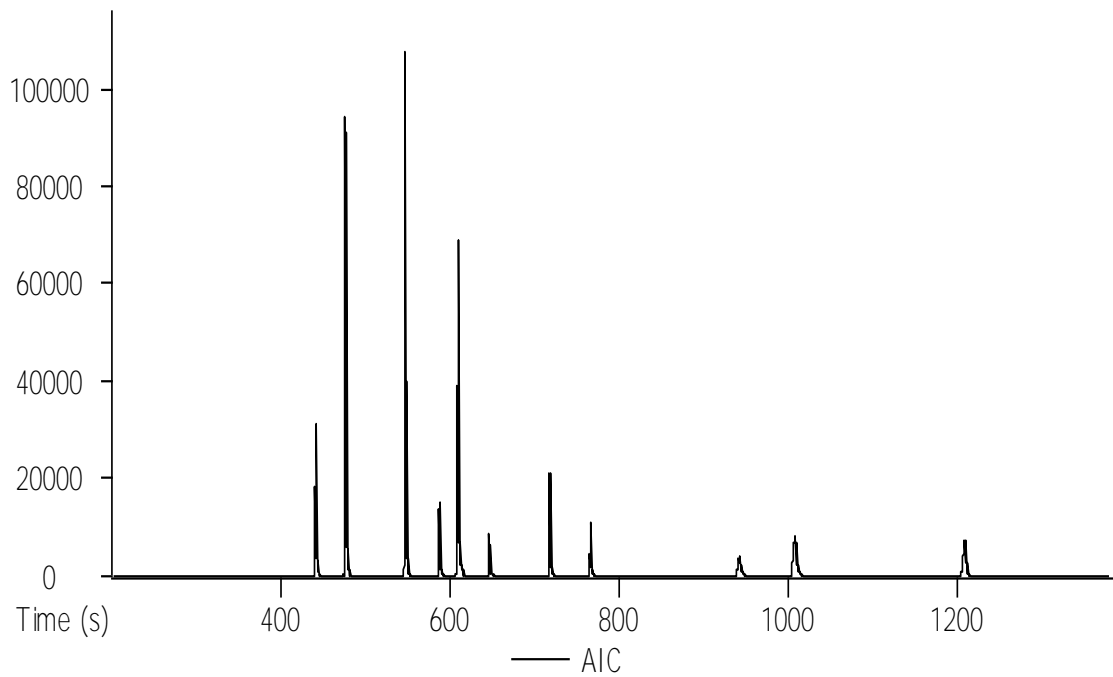


Figura 30A. Cromatograma de la muestra 1 de fogón 2 “fondo” para la determinación de esteroides

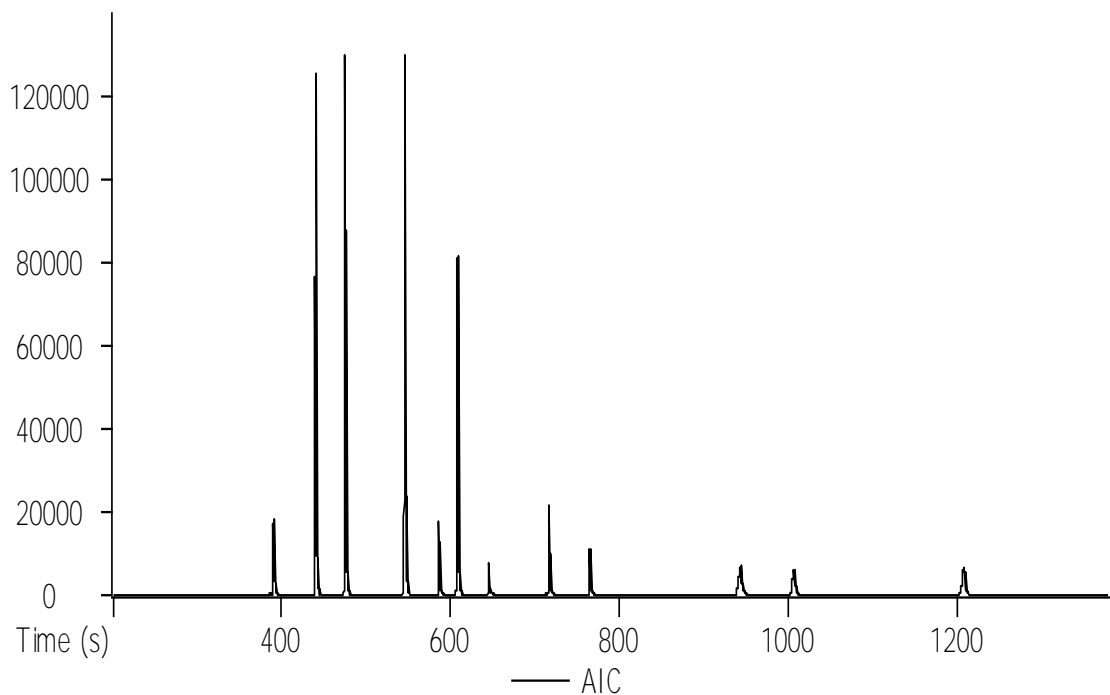


Figura 31A. Cromatograma de la muestra 2 de fogón 2 “fondo” para la determinación de esteroides

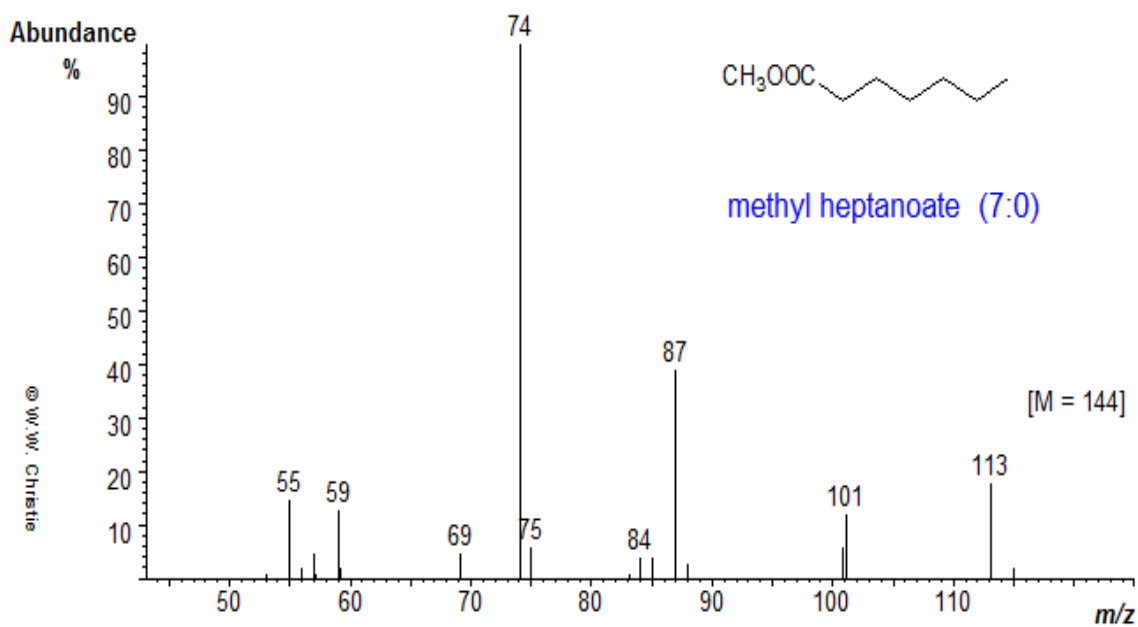


Figura 32A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido heptanoico (Christie, 2015)

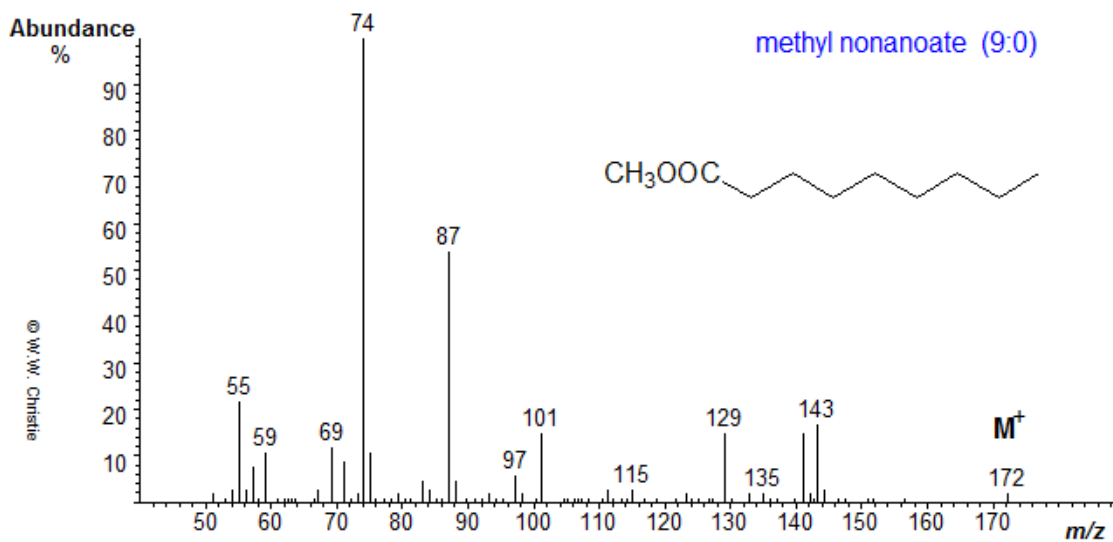


Figura 33A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido nonanóico (Christie, 2015)

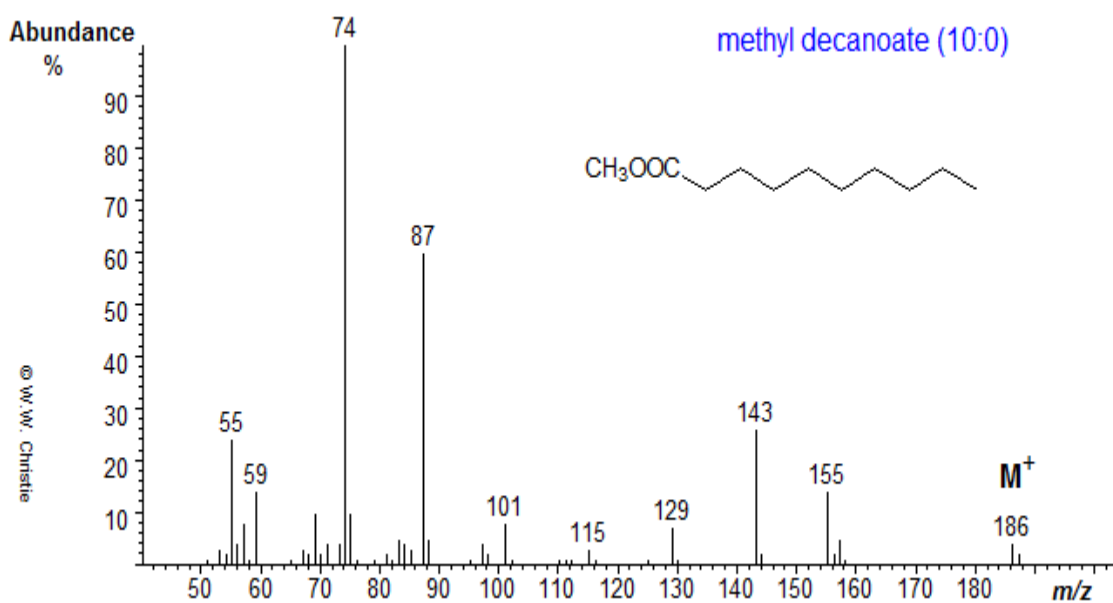


Figura 34A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido decanóico (Christie, 2015)

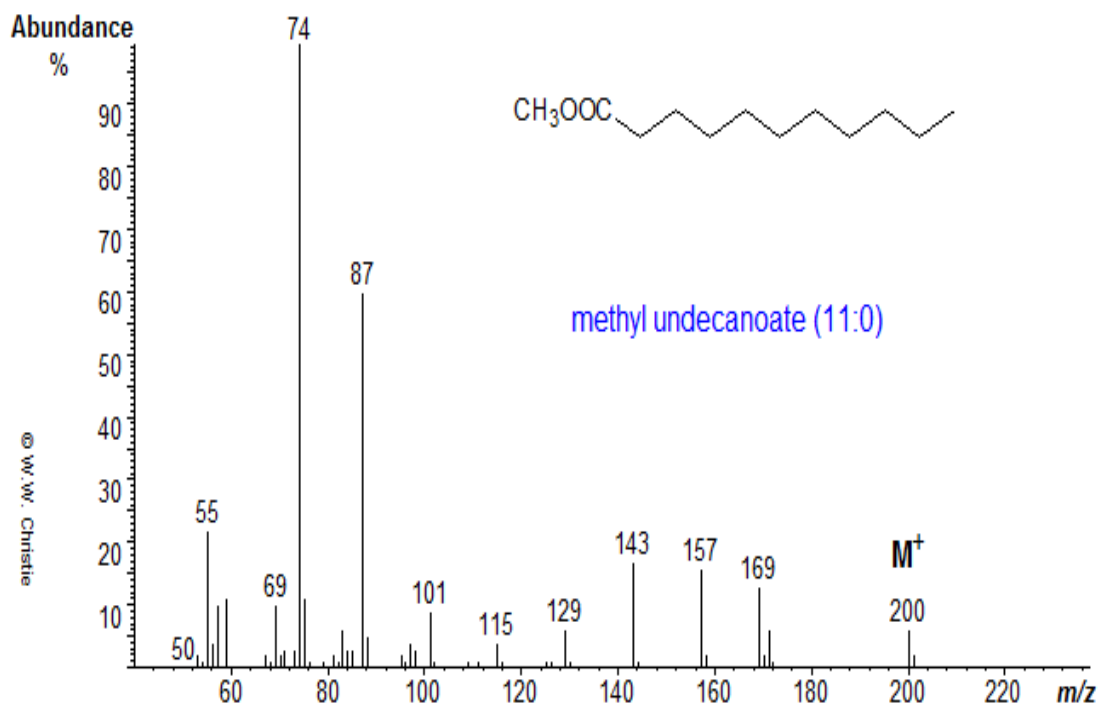


Figura 35A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido undecanoico (Christie, 2015)

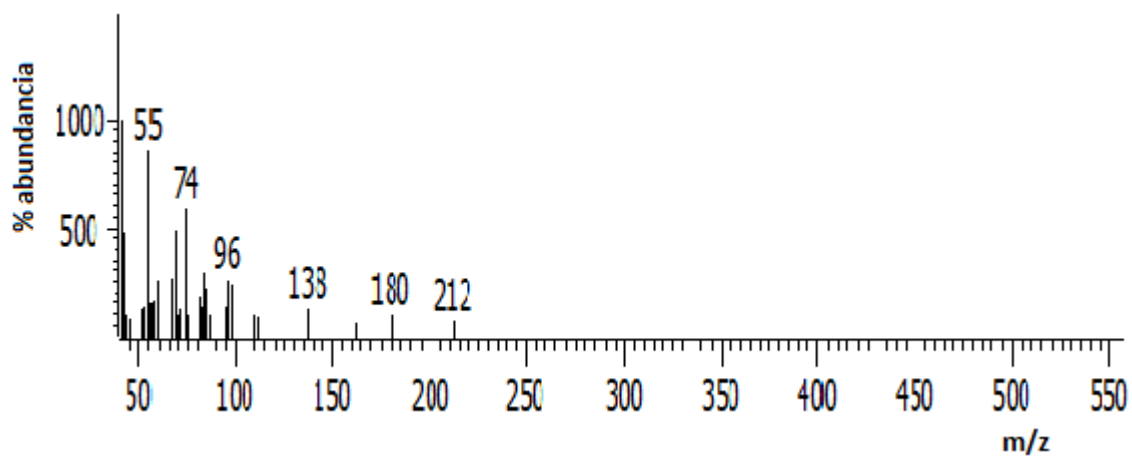


Figura 36A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 9-Dodecenoico

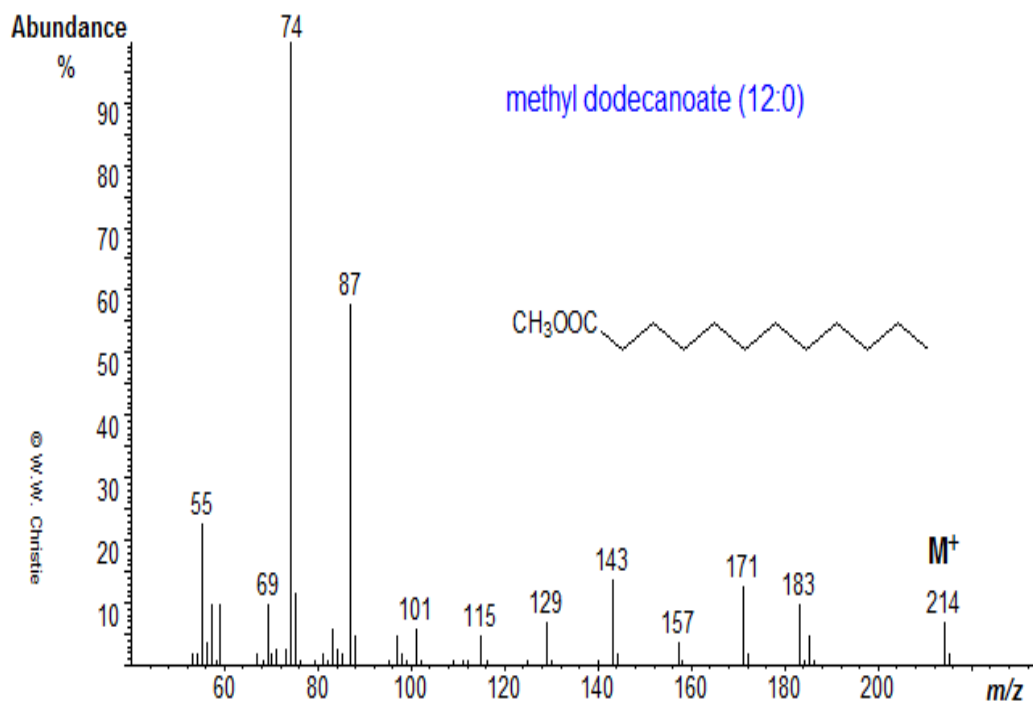


Figura 37A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido Dodecanoico (Christie, 2015)

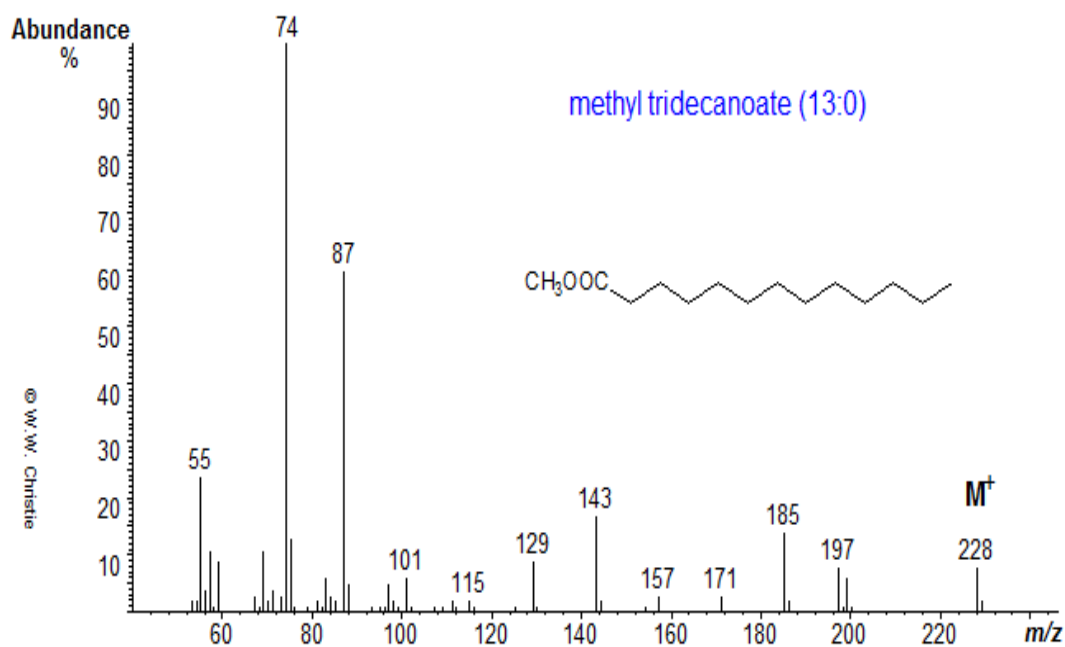


Figura 38A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido tridecano (Christie, 2015)

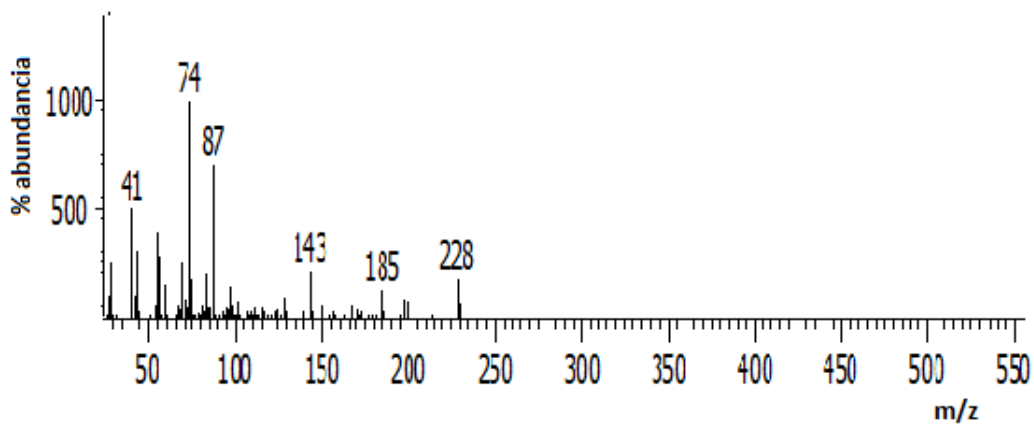


Figura 39A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 10-metil dodecanoico

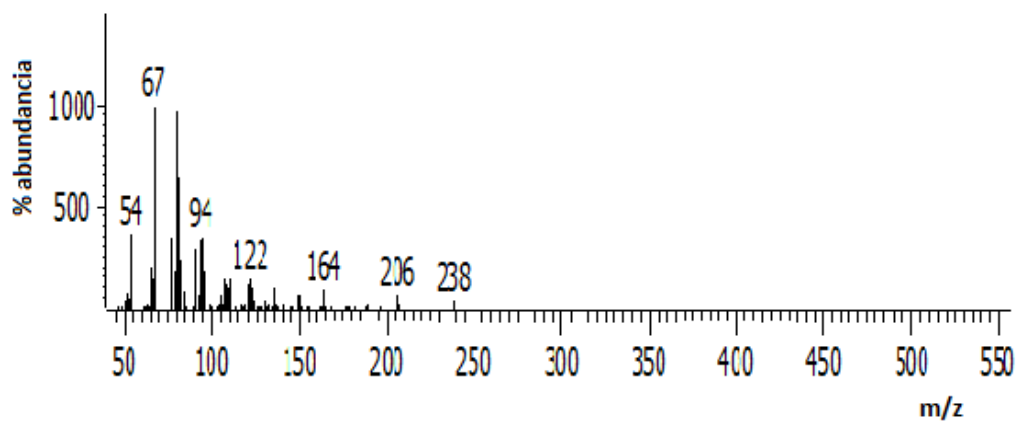


Figura 40A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 12,13-tetradecadienoico

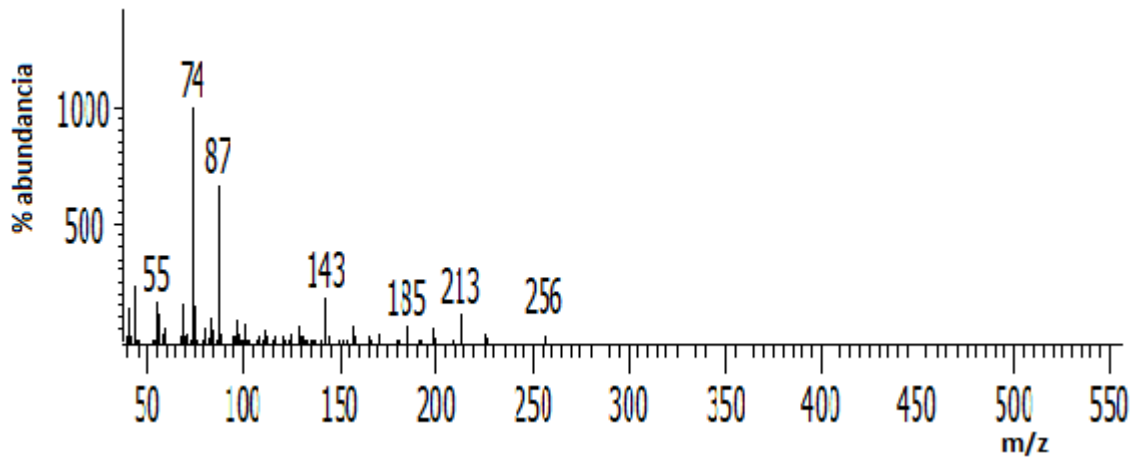


Figura 41A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 9 tetradecanoato

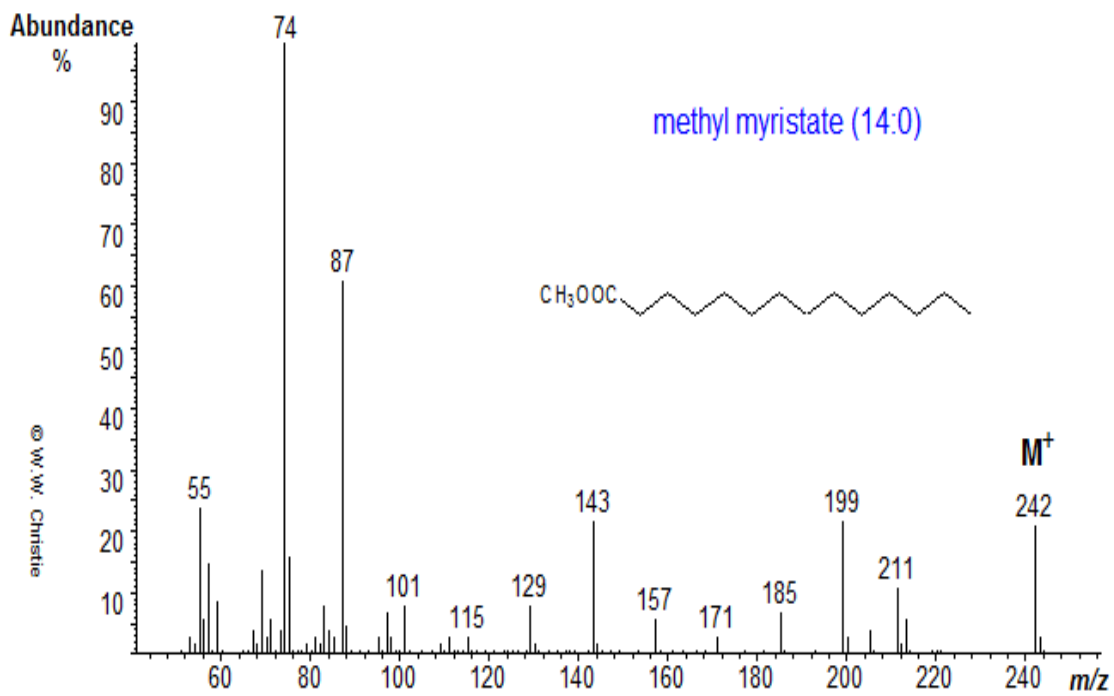


Figura 42A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido tetradecanoico(Christie, 2015)

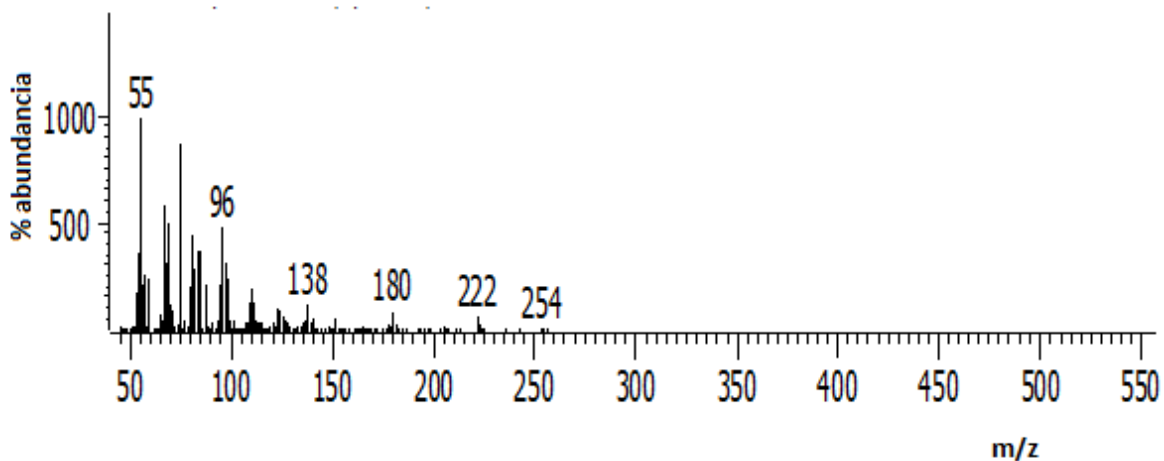


Figura 43A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido cis-10 pentadecanoico

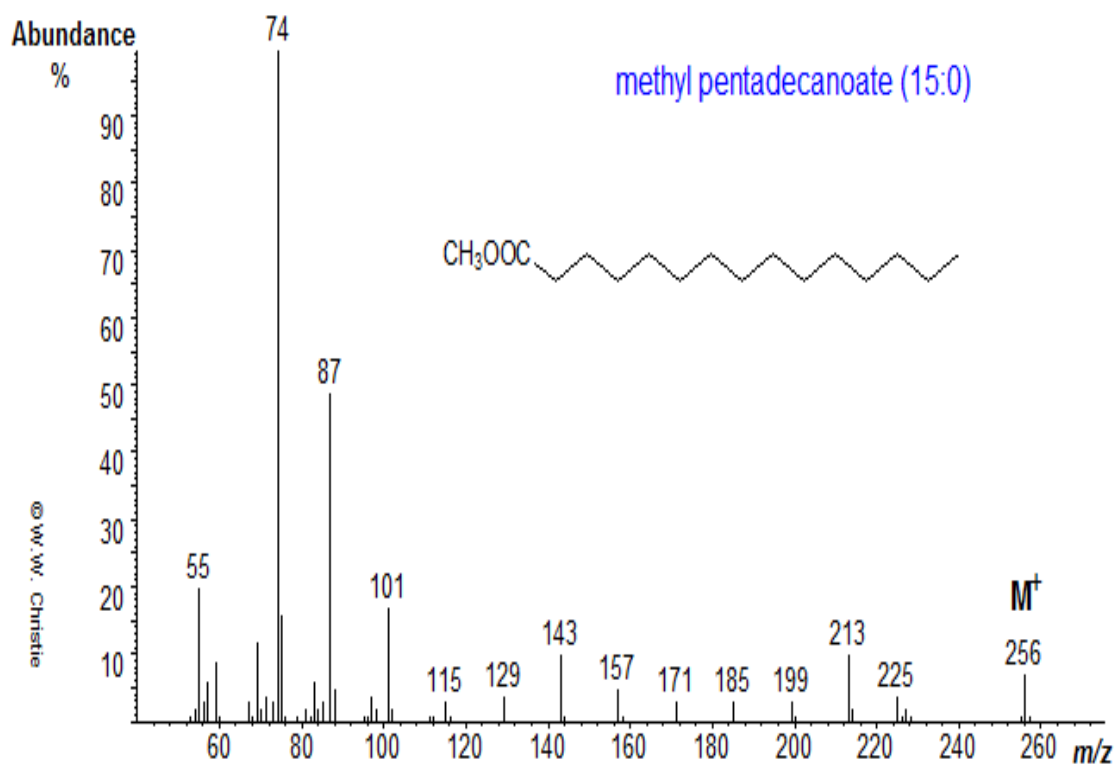


Figura 44A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido pentadecanoico (Christie, 2015)

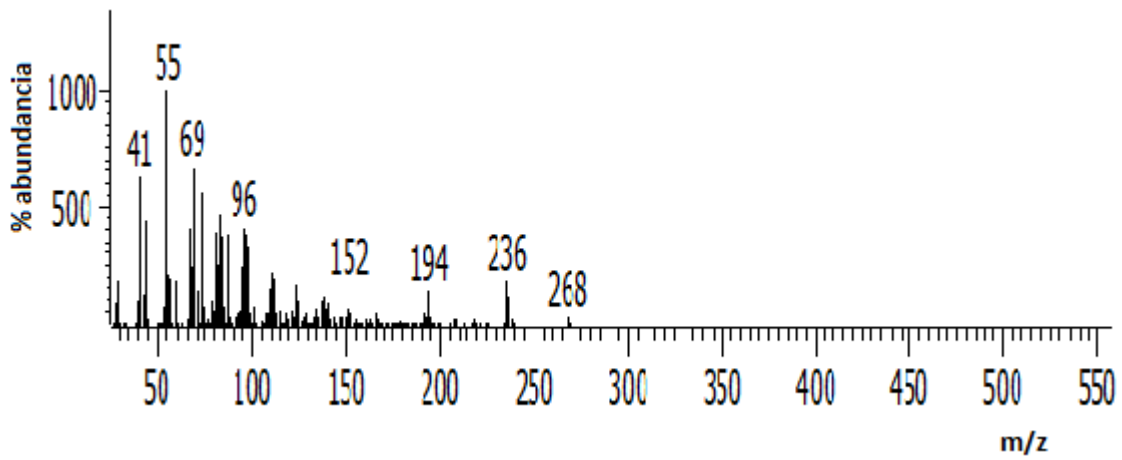


Figura 45A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 9-hexadecanoico

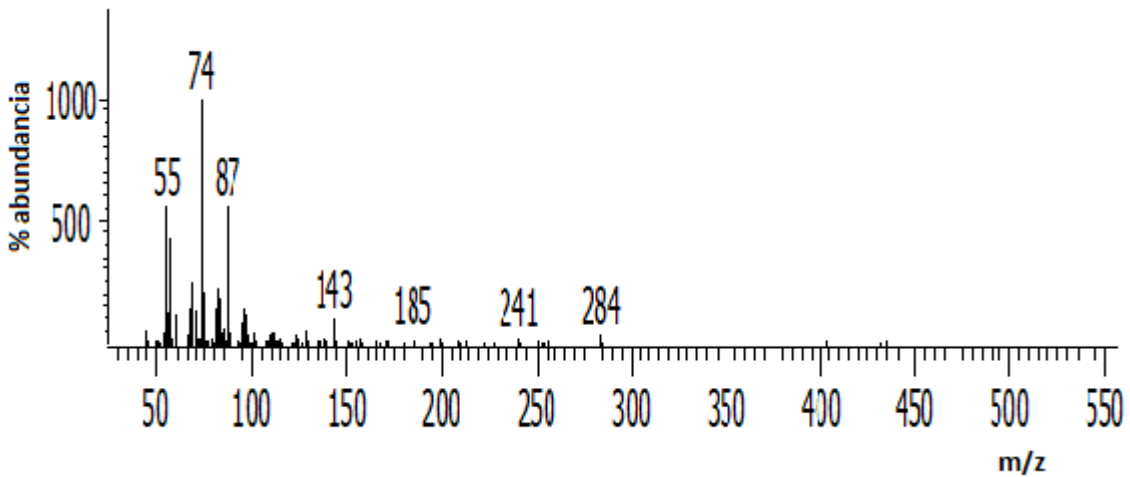


Figura 46A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 11-Hexadecanoico

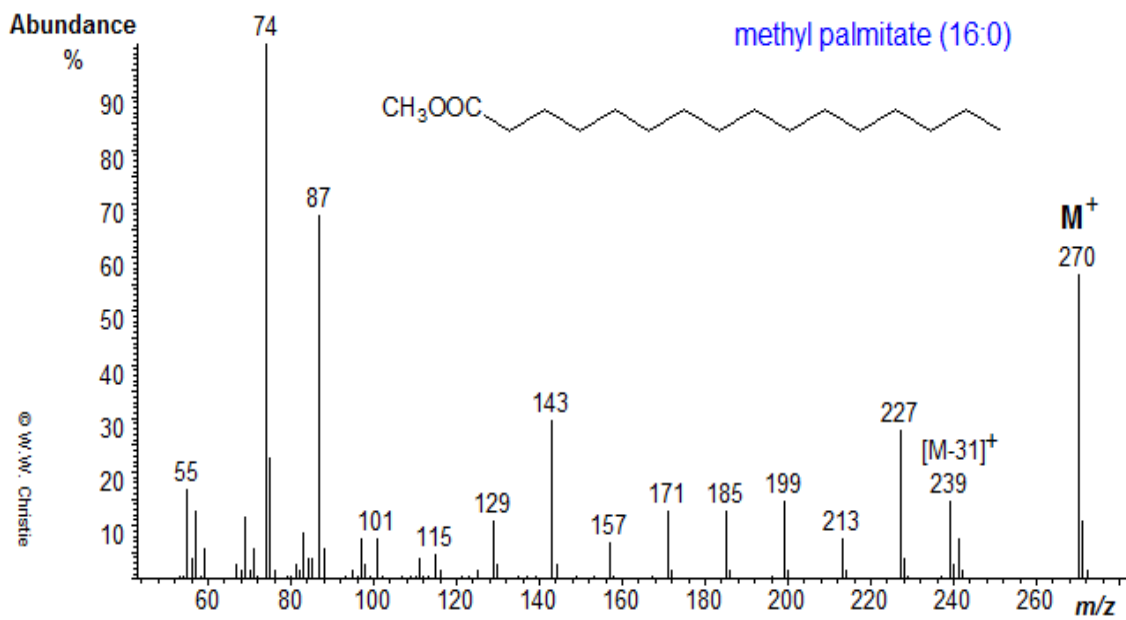


Figura 47A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido hexadecanoico (Christie, 2015)

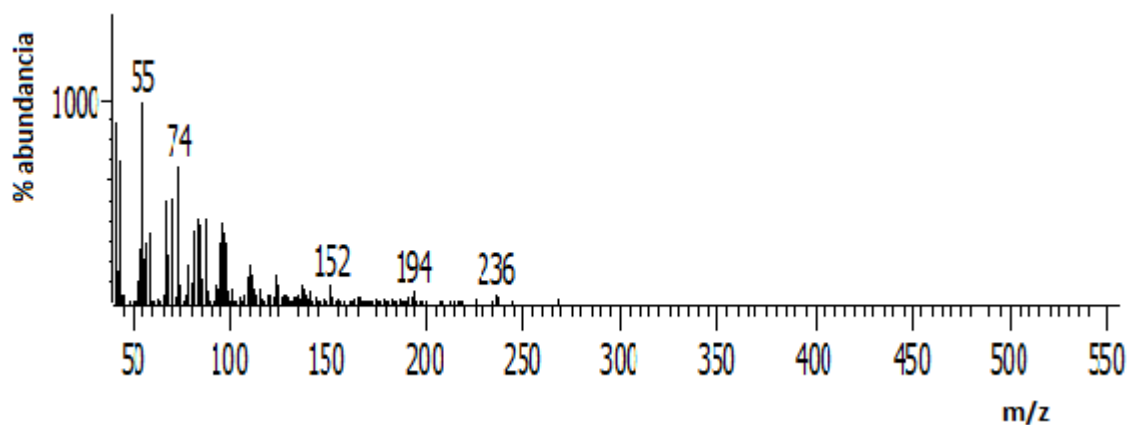


Figura 48A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 7 metil-6-Hexadecanoico

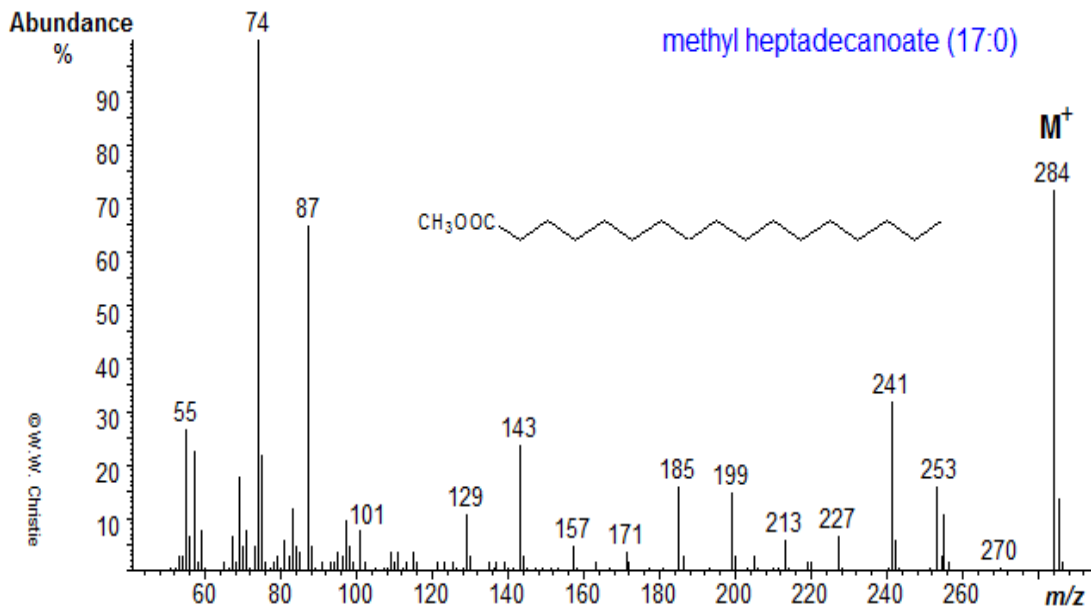


Figura 49A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido heptadecanoico (Christie, 2015)

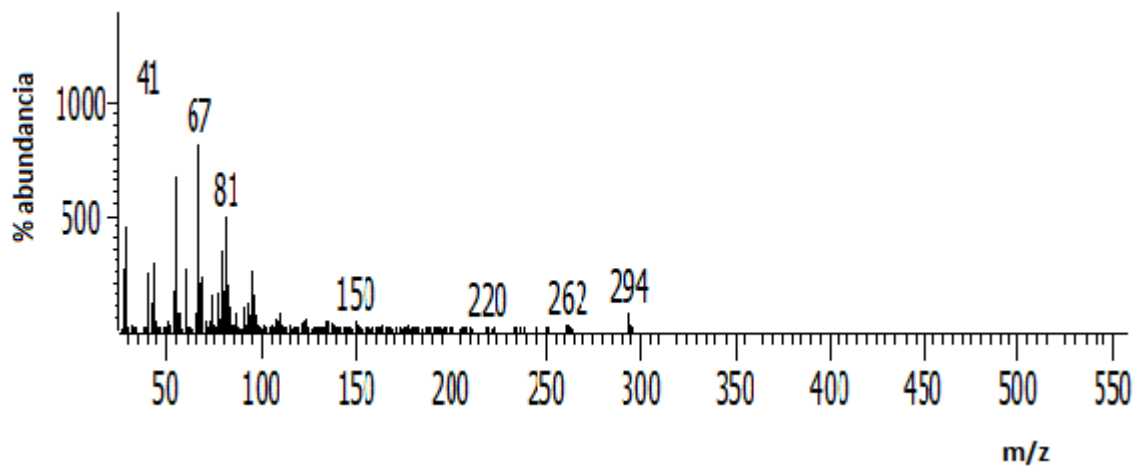


Figura 50A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 9,12-Octadecadienoico

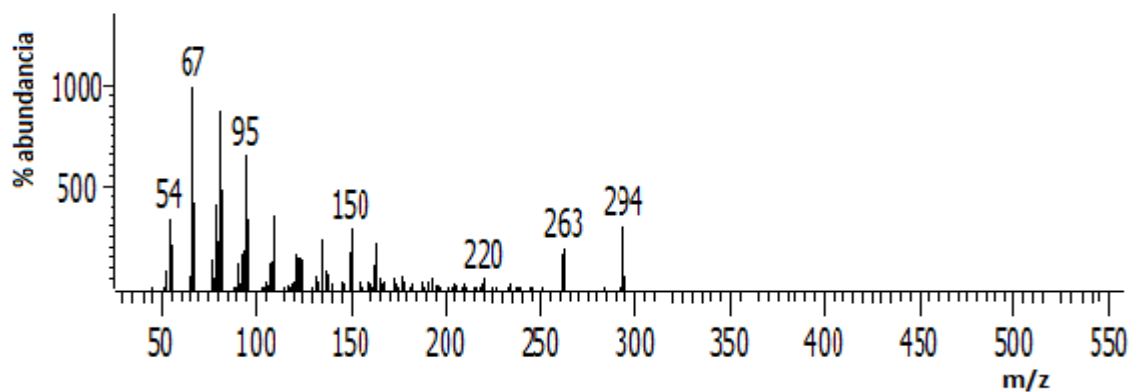


Figura 51A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 6,9-octadecadienoico

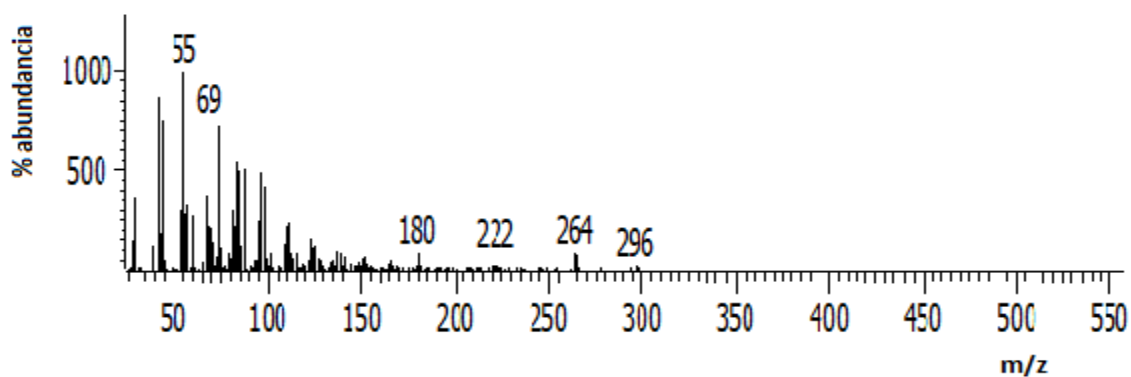


Figura 52A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 9-Octadecanoico

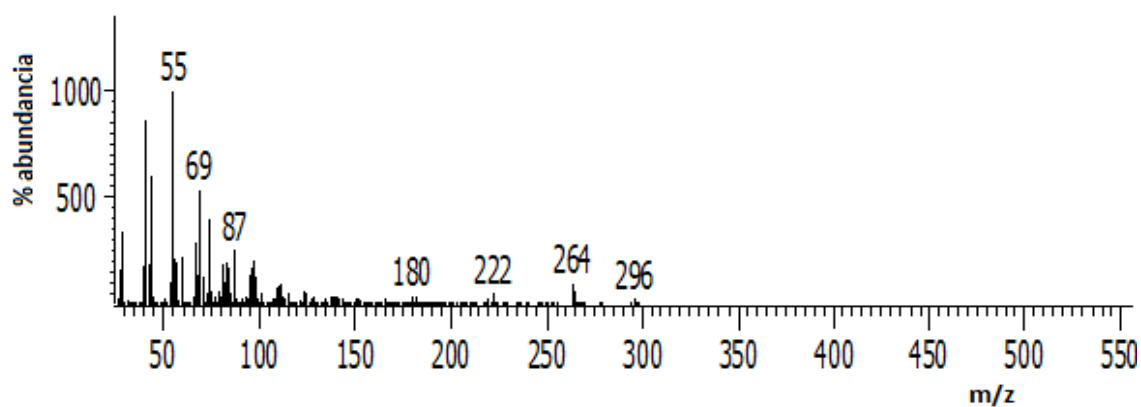


Figura 53A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido 11-Octadecanoico

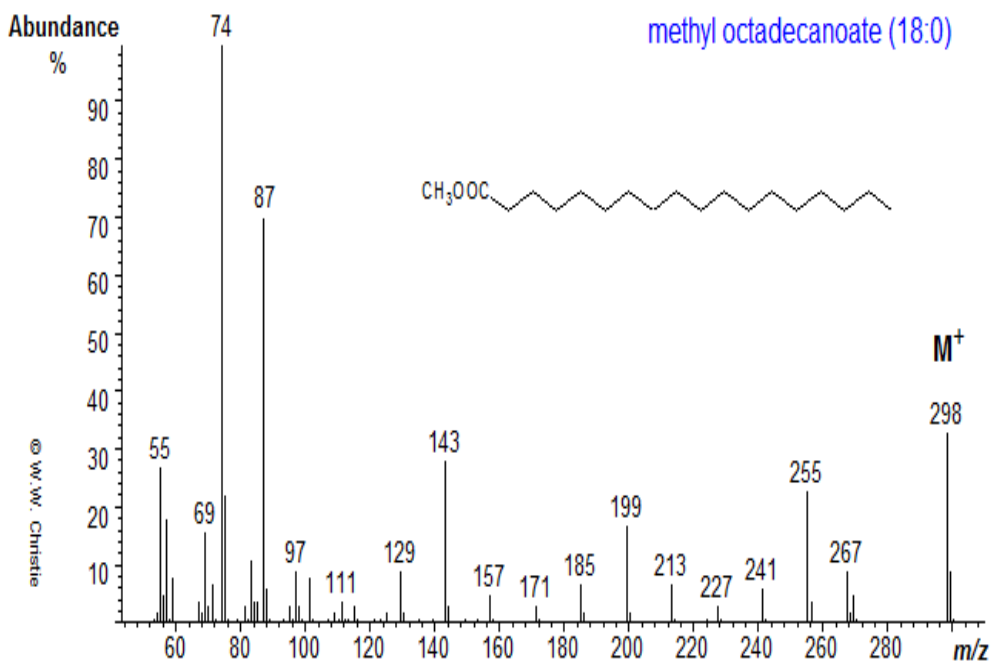


Figura 54A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido octadecanoico (Christie, 2015)

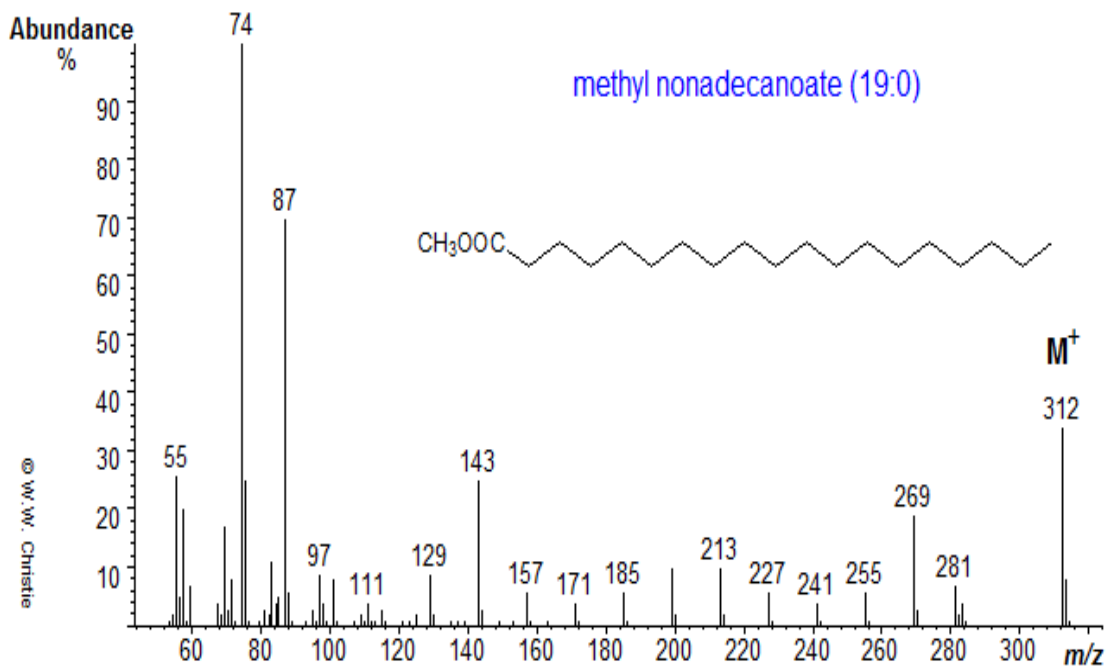


Figura 55A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido nonadecanoato (Christie, 2015)

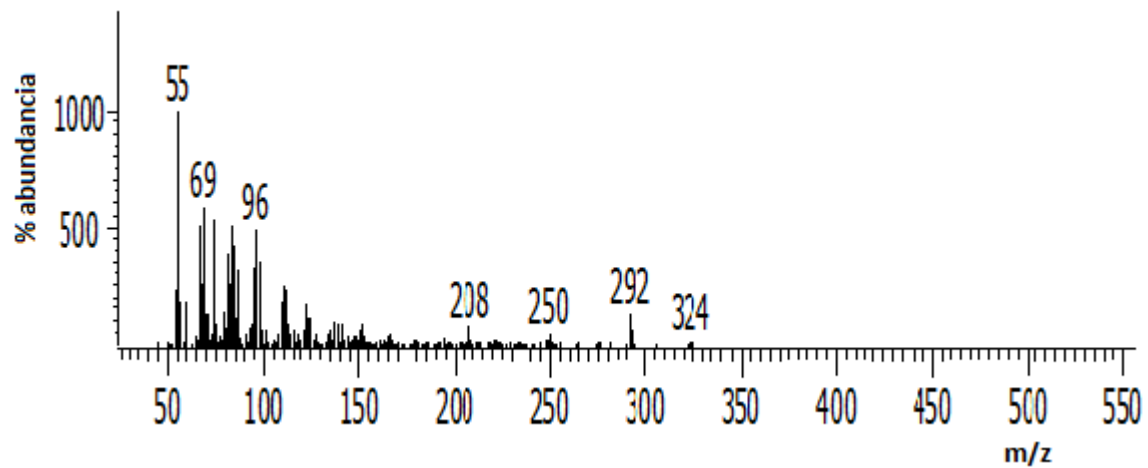


Figura 56A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido cis-11-Eicosanoico

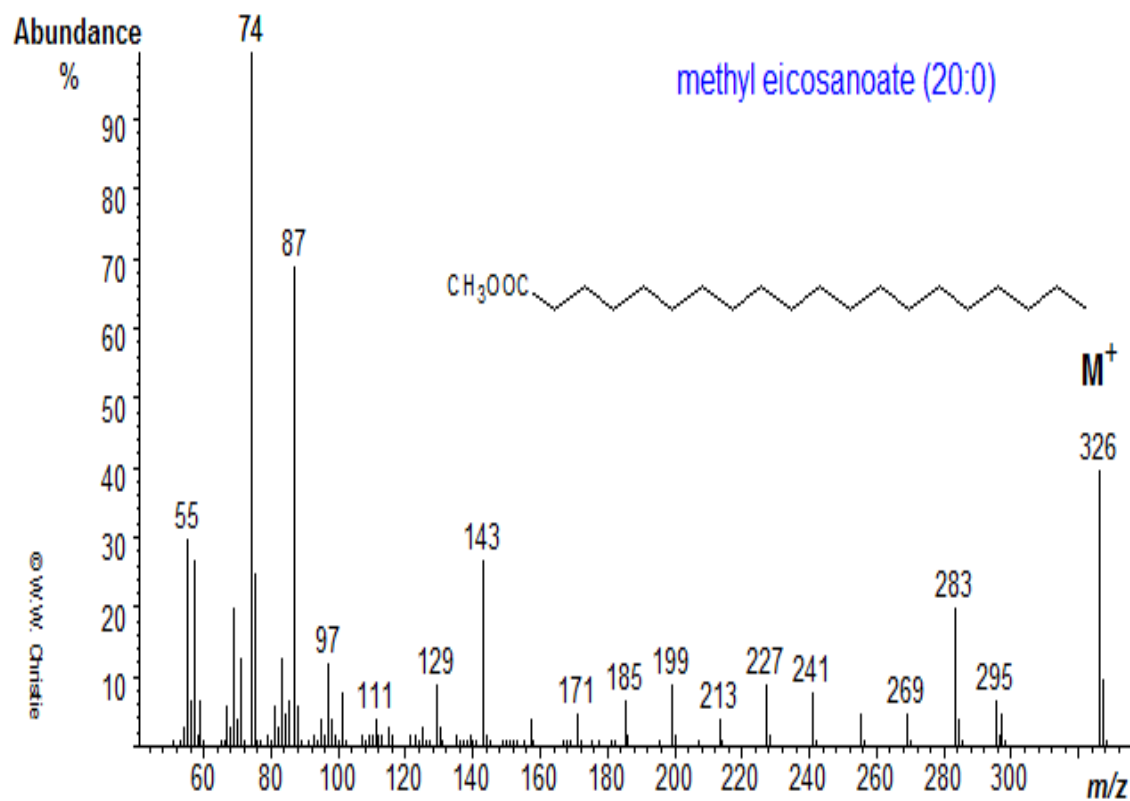


Figura 57A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido eicosanoico (Christie, 2015)

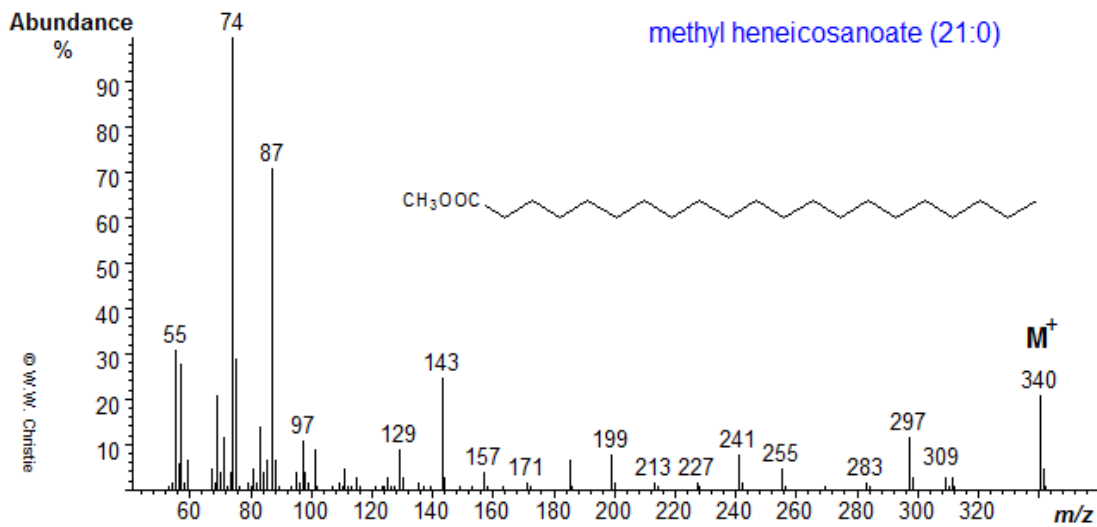


Figura 58A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido heneicosanoico (Christie, 2015)

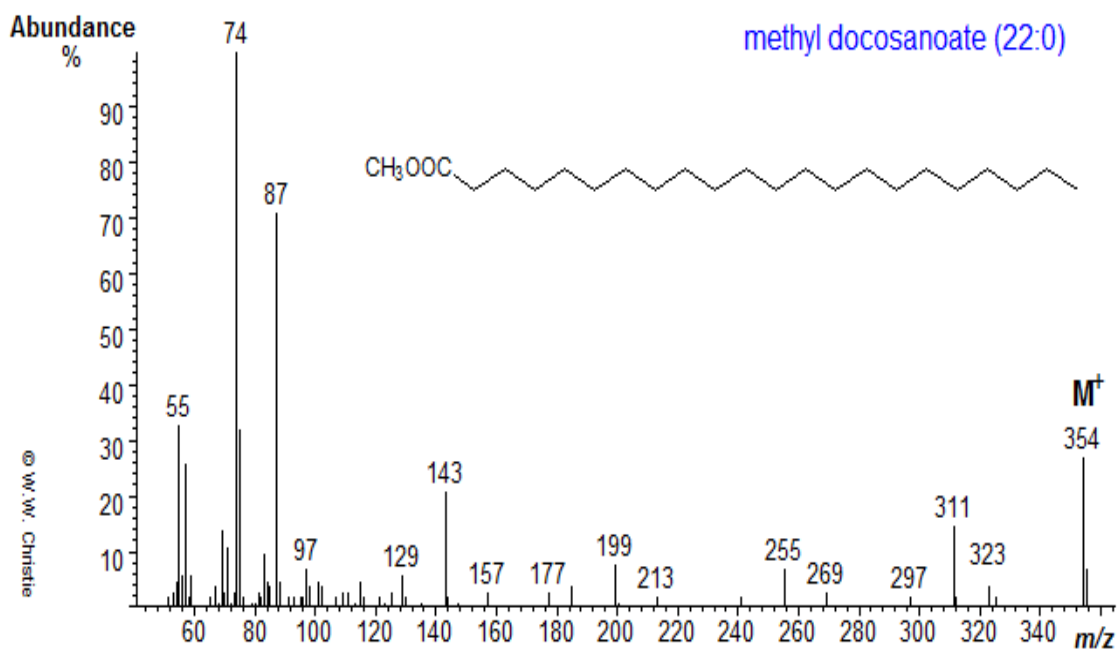


Figura 59A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido docosanoico (Christie, 2015)

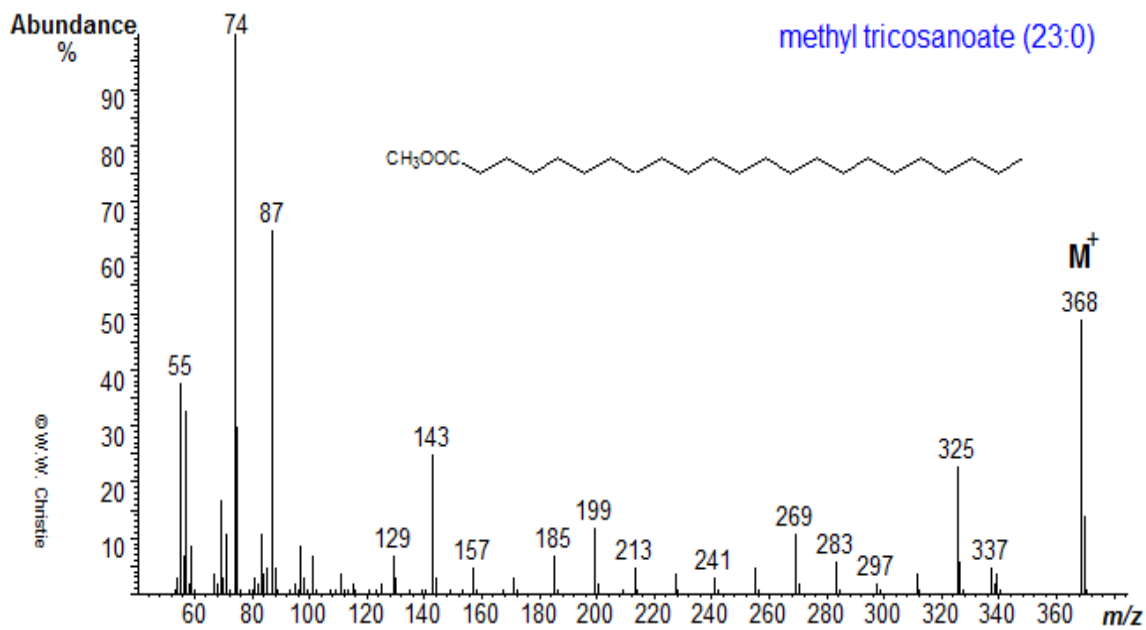


Figura 60A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido tricosenoico (Christie, 2015)

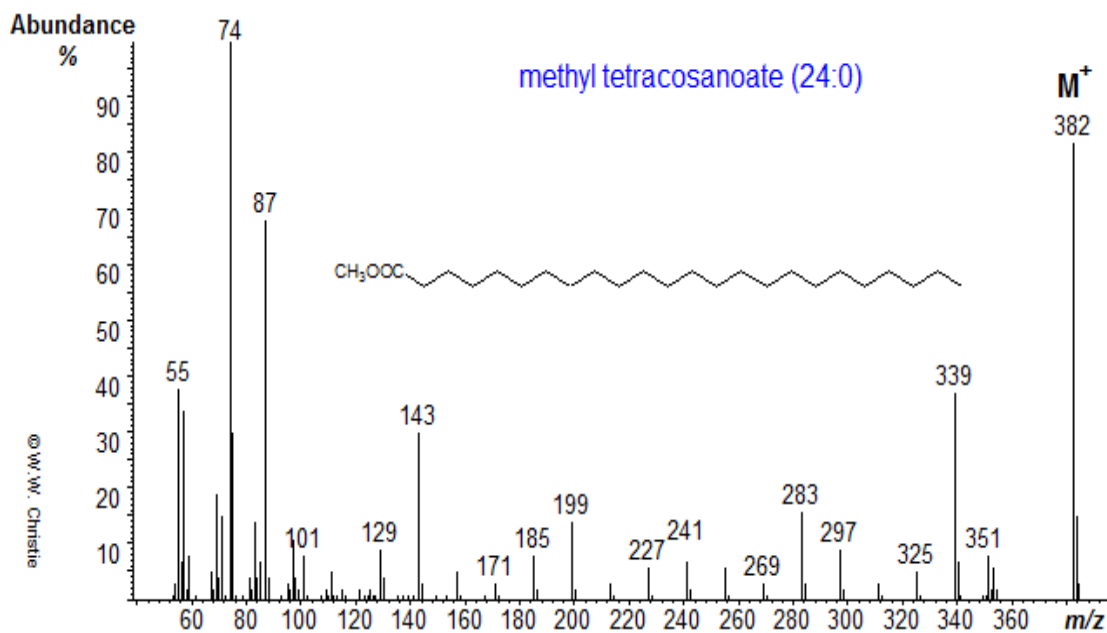


Figura 61A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del éster metílico del ácido tetracosanoico (Christie, 2015)

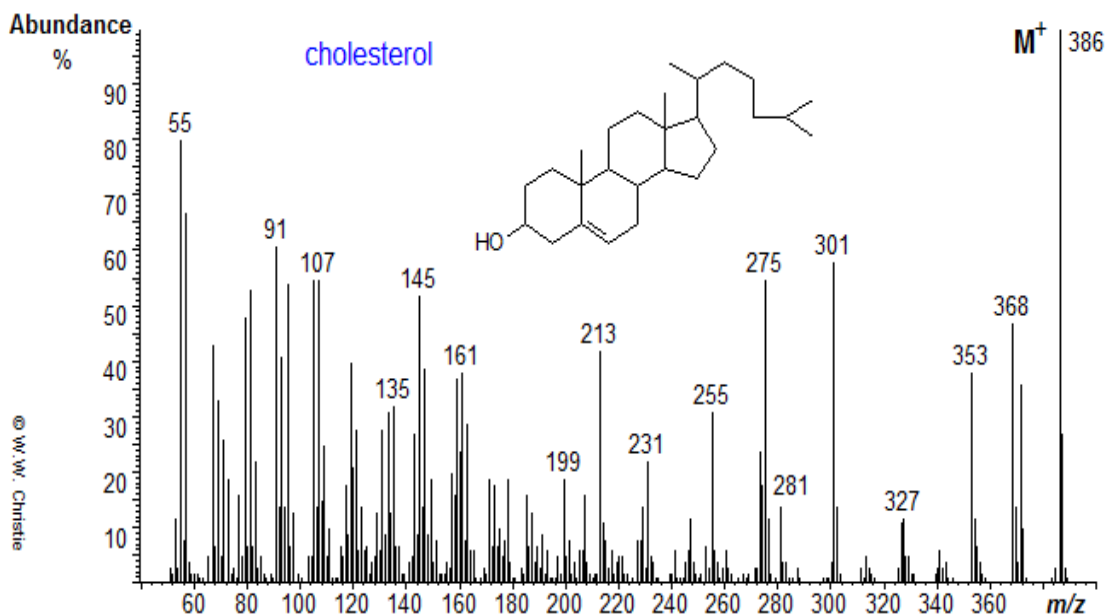


Figura 62A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del colesterol (Christie, 2015)

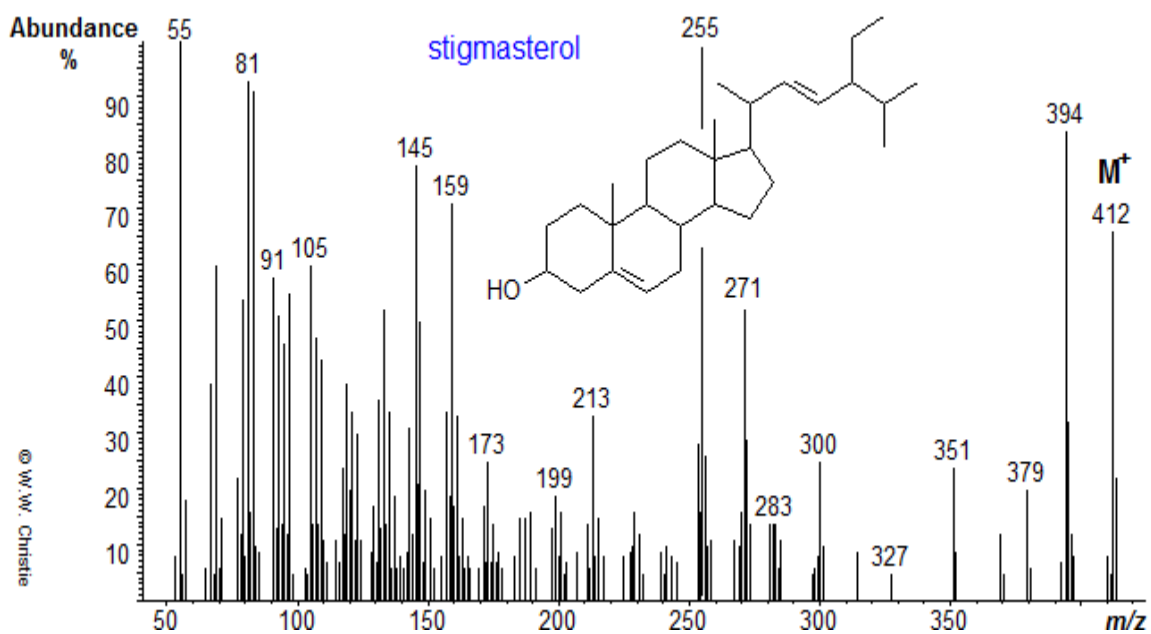


Figura 63A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del estigmasterol (Christie, 2015)

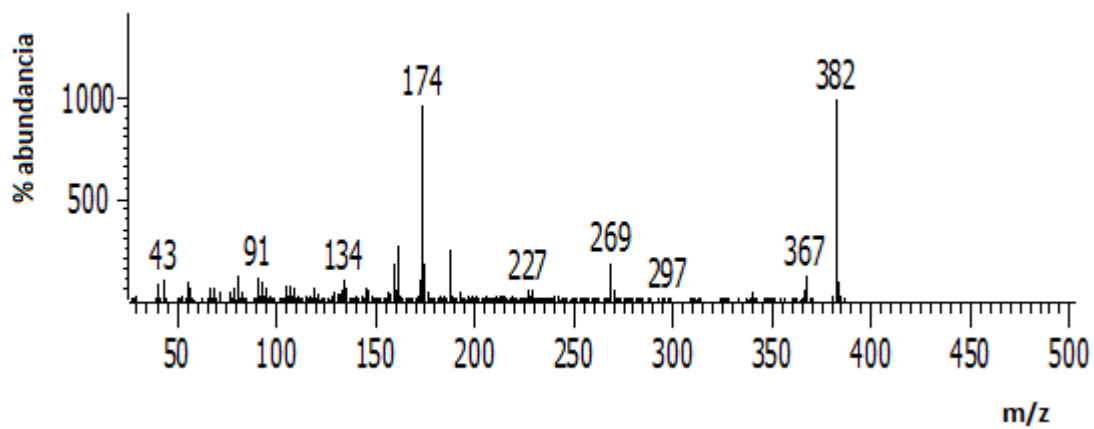
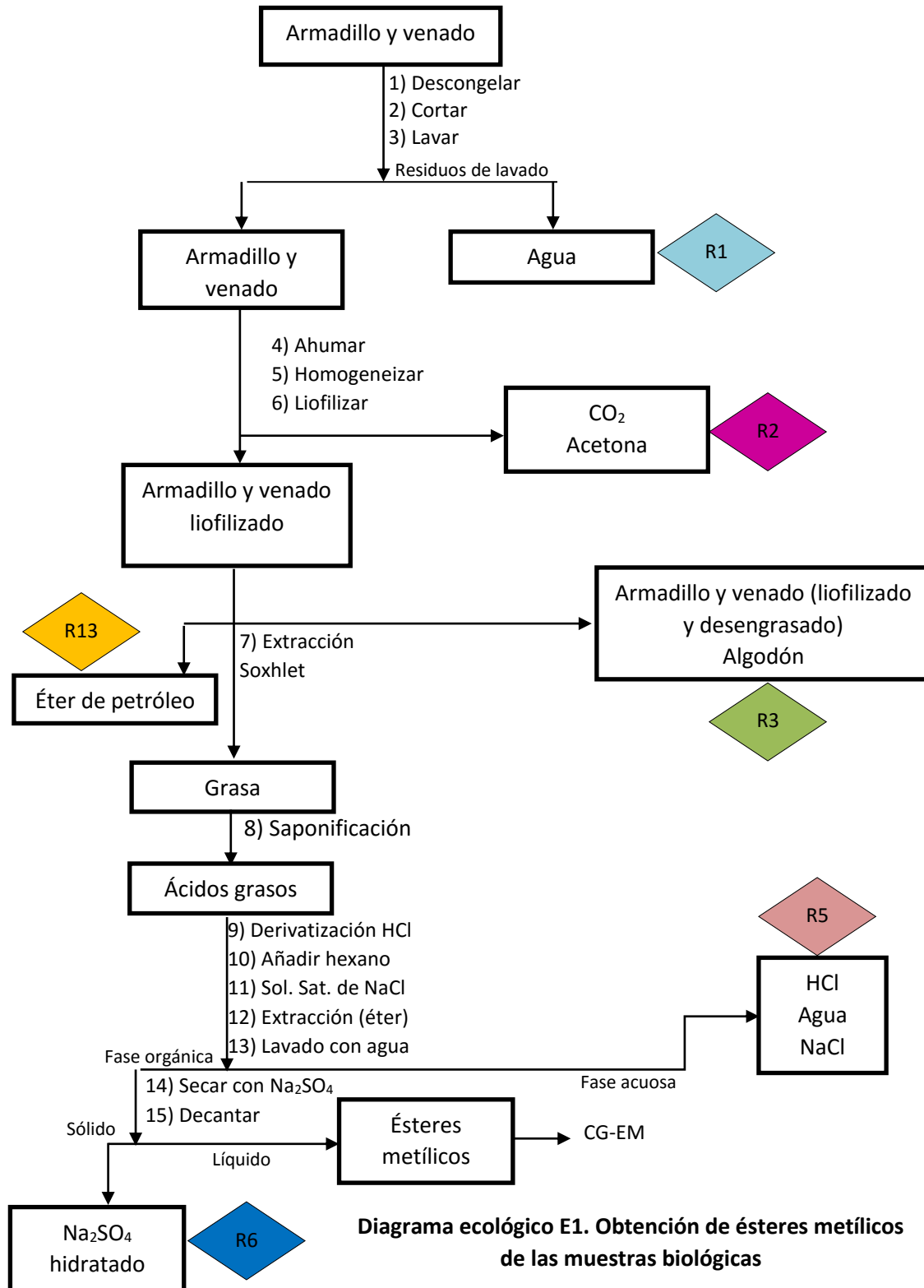


Figura 67A. Espectro de masas por *EI* (impacto electrónico, en inglés) del 3,5-colestadien-7-ona

ANEXO B

DIAGRAMAS ECOLÓGICOS



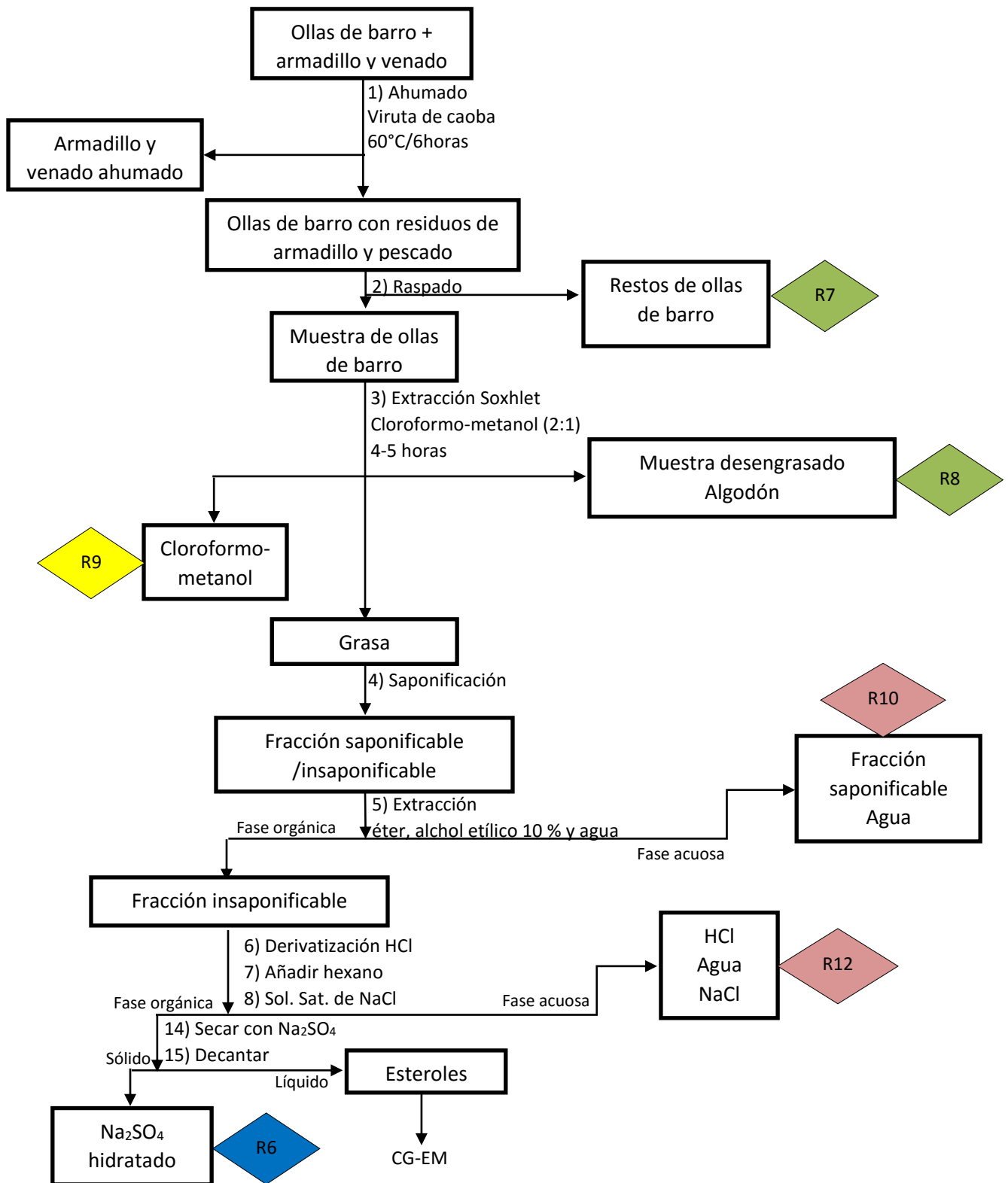


Diagrama ecológico E2. Obtención de esteroides en las muestras de ollas de barro (experimento piloto)

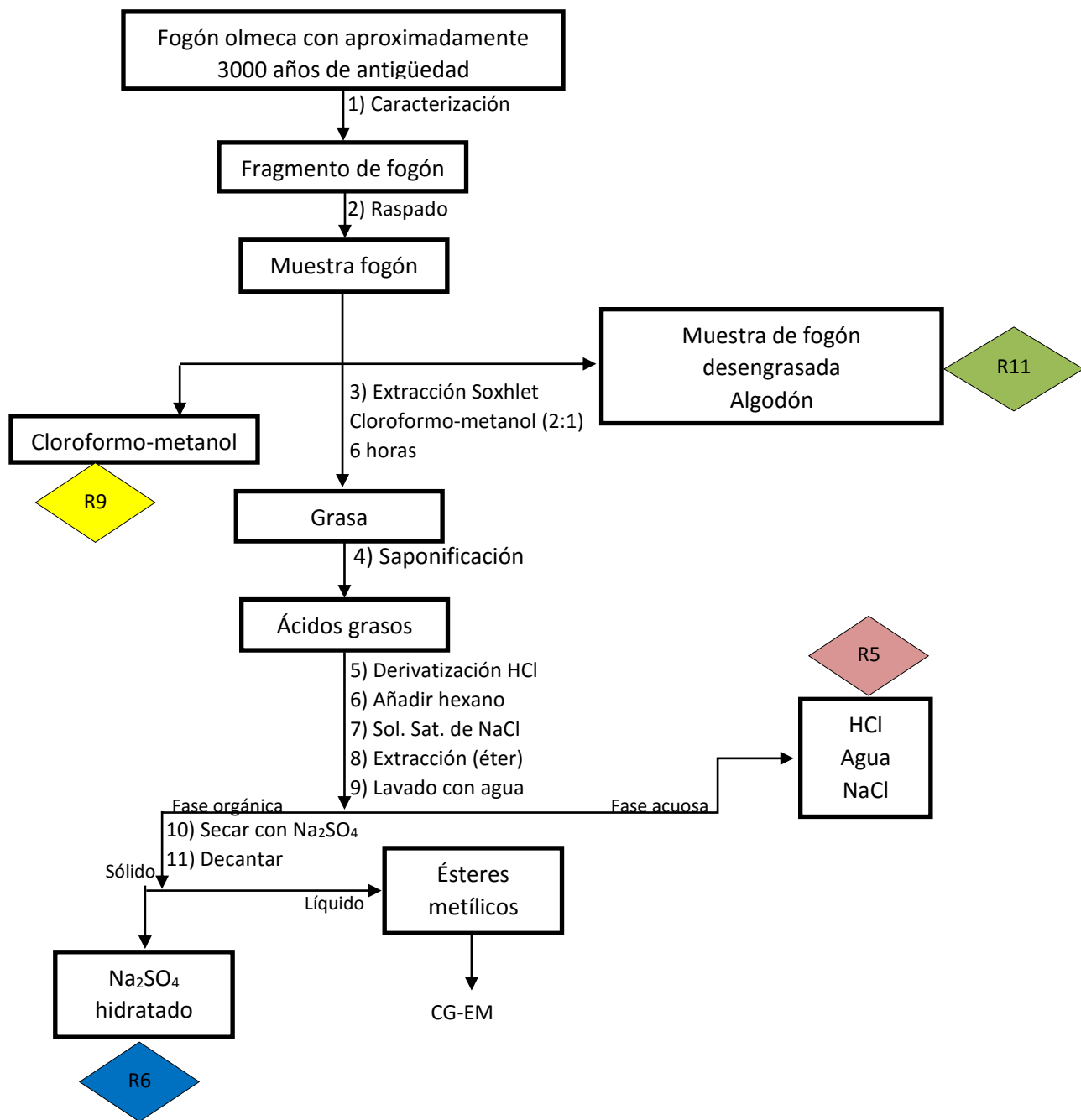


Diagrama ecológico E3. Obtención de ésteres metílicos de las muestras de fogones

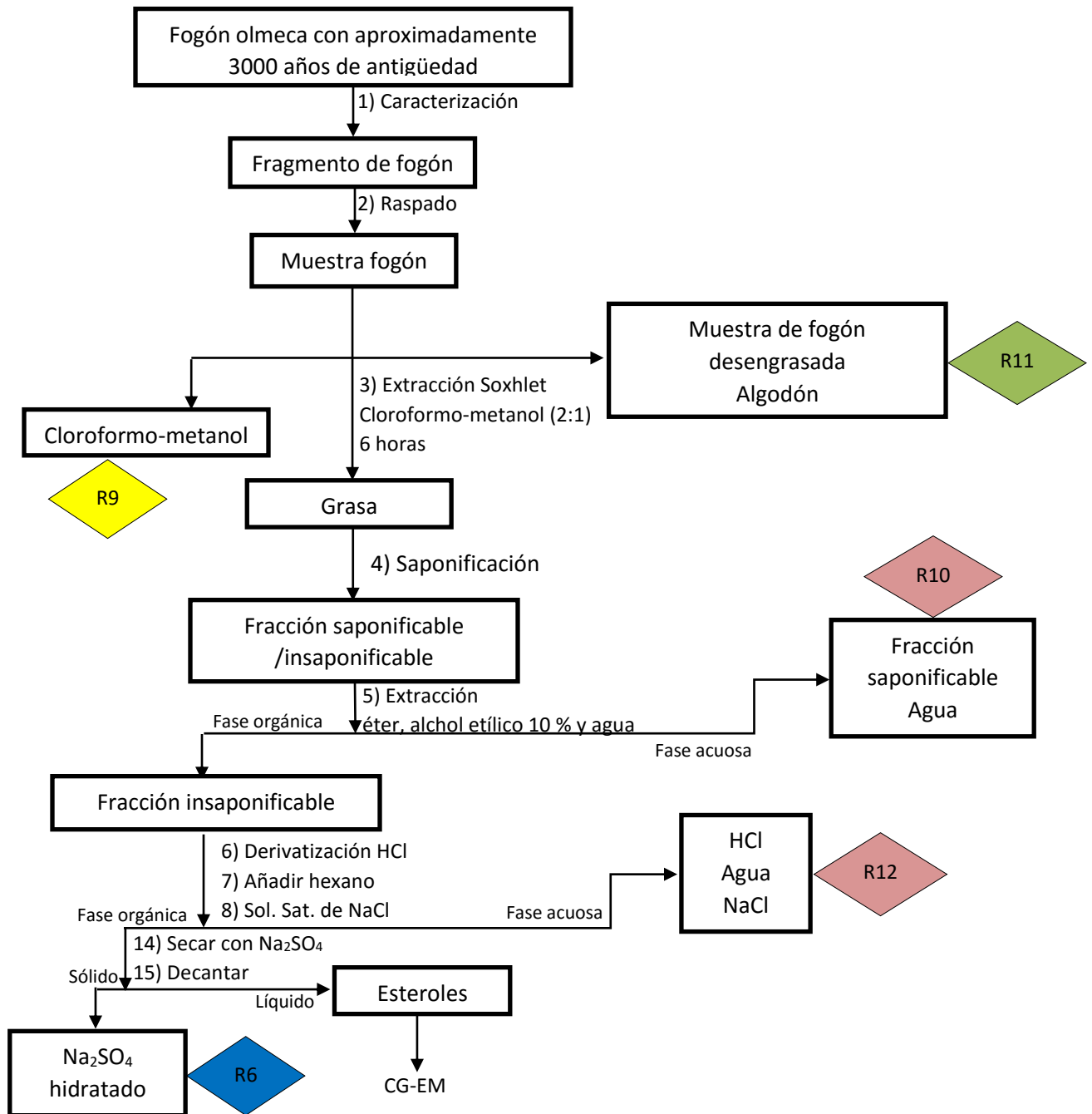


Diagrama ecológico E4. Obtención de esteroides en las muestras de fogones

Residuos

R1. Agua de lavado de armadillo y venado. Se desecha en el drenaje con otros residuos no peligrosos.

R2. CO₂ y acetona. Se deja que se evapore la mezcla en la campana de extracción

R3, R7, R8 y R11. Muestra desengrasada (carne/olla con residuos/fragmento arqueológico) y algodón, con restos de disolvente orgánico. Se deja evaporar el resto del disolvente en campana de extracción y se envía a disposición para producir composta o se desechan en la basura orgánica

R4, R9. La mezcla de cloroformo- metanol puede ser reutilizado si no está contaminado con trazas de barro. En caso de desecharlo se coloca en un frasco, se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM.

R5, R10 y R12. Residuos de NaCl, HCl, trazas de metanol y fracción saponificable de las grasas. Se colocan en un frasco, se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM

R6. Na₂SO₄ hidratado que se recristaliza y se seca (agregando etanol y en la estufa) para ser reutilizado

R13. Éter de petróleo, fue reutilizado en etapas posteriores del análisis de ésteres metílicos y esteroides

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anónimo. 2014. *San Lorenzo (centro olmeca)*. [En línea] Disponible en: <http://www.historiacultural.com/2012/08/san-lorenzo-tenochtitlan-olmecas.html> (Último acceso 17 de noviembre de 2014).

Arias-Rodríguez, E. 1999. *Recetario indígena del sur de Veracruz*. 1º Edición. Ed. CONACULTA. Ciudad de México, México P. 246

Arieta-Baizabal, V. 2013. Densidad poblacional Olmeca y sus implicaciones en el sitio arqueológico de San Lorenzo, Veracruz. Tesis doctoral. UNAM. Facultad de Filosofía y Letras. Ciudad de México, México. P. 163

Arieta-Baizabal, V. 2009. Densidad poblacional Olmeca: el caso de una terraza doméstica en San Lorenzo, Veracruz. Tesis de maestría. UNAM. Facultad de Filosofía y Letras. Ciudad de México, México. P. 311

Baduí-Dergal, S. 2006. *Química de los alimentos*. 4ª edición. Editorial Person Ciudad de México, México. Pp. 245-301

Barba-Pingarrón, L., Ortiz-Butrón, A. y Pecci, A. 2013. Los residuos químicos. Indicadores arqueológicos para entender la producción, preparación, consumo y almacenamiento de alimentos en Mesoamérica. *Anales de Antropología*, 48(1):201-239

Belitz, H. D. 1988. *Química de los alimentos*. 2ª edición. Editorial Acribia. Zaragoza. Pp. 211-279

Boatella, J., Codony, R., Guardiola, F. y Rafecas, M. 1994. Metodología analítica para la determinación de oxisteroles. *Grasas y Aceites*, 45(3):164-192

Boatella, J., Codony, R., Guardiola, F. y Rafecas, M. 1995. Formación de derivados oxidados del colesterol en alimentos. *Grasas y Aceites*, 46(3):202-212

Cabrera, L. 2002. *Diccionario de aztequismos*. 5ª Edición. Editorial Colofón. Ciudad de México, México

Camarena-Fernández, M. 2011. Estudio de la variación espacio-temporal de la composición de la materia orgánica, por medio de la especiación de esteroides en la bocana en la costa norte de Yucatán. Tesis de maestría. UNAM. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Ciudad de México, México P. 124

Cañada, P. 2011. *Espectrometría de masas. Técnicas*. [En línea] Disponible en: <http://www.scai.uma.es/servicios/aqcm/ems/ems.html> (Último acceso 17 de noviembre de 2014)

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

Casio-Arreola, N.G. y Luna-Estrada, A.M.J. 2014. Estudio de residuos de lípidos en un fogón de 3000 años de antigüedad y su comparación con muestras alimenticias. *Tesis profesional*. UNAM. Facultad de Química. Ciudad de México, México. P. 112

Christie, W. 2015. Mass specrometry of fatty acid derivates [En línea] Disponible en: <http://lipidlibrary.aocs.org/index.cfm> (actualizado el 15 de agosto del 2015)

Ciliberto, E. y Spoto, G. Editores. 2000. *Modern analytical methods in art and archaeology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, EE.UU. Pp. 177-329

Cyphers, A. 2007. Surgimiento y decadencia de San Lorenzo, Veracruz: del Ojochi al Nacaste. *Arqueología Mexicana*, 15(87):36-42

Cyphers, A., Zurita Noguera, J. y Lane-Rodríguez, M. 2013. *Retos y riesgos en la vida olmeca*. UNAM. Ciudad de México, México. P. 178

Cyphers, A. Editora. 2014. *Herencia y futuro*. Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental, A.C. Ciudad de México, México. P. 94

DOF. 1978. NMX-F-089-S-1978. Determinación de extracto etéreo (método Soxhlet) en alimentos. Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos

DOF. 2006. NMX-K-306-SCFI-2006. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación de materia insaponificable. Método de prueba. Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos

DOF. 2009. Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. Jueves 24 de septiembre de 2009 Diario Oficial (Primera Sección). Tabla 21 - Reglas para la escritura de los números y su signo decimal. Signo decimal El signo decimal debe ser una coma sobre la línea (,) o un punto sobre la línea (.). Si la magnitud de un número es menor que la unidad, el signo decimal debe ser precedido por un cero. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos

DOF. 2011. NMX-F-017-SCFI-2011 Alimentos aceites y grasas. Determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases en columna empacada – Método de prueba (Cancela a la NMX-F-017-SCFI-2005). Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos

Evershed, R.P. 2008. Organic residue analysis in archaeology: The archaeological biomarker revolution. *Archaeometry*, 50(6):895-924

Florescano E. 2007. Los olmecas: el primer reino de Mesoamérica. *Revista de la universidad de México*, 38(5):5-18

Hernández-Hernández, L. y González-Pérez, C. 2002. *Introducción al análisis instrumental*. 1ª Edición. Ariel Editorial, S.A. Barcelona. P. 260

INECC. 2015. *Los ecosistemas en México*. [En línea] Disponible en: <http://www.inecc.gob.mx/con-eco-ch/382-hc-ecosistemas-mexico> (Último acceso 7 de mayo de 2015)

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

Lupano, C.E. 2013. Modificaciones de componentes de los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento. Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina

Malainey, M.E. 2007. Fatty acid analysis of archaeological residues procedures and possibilities. En: J.W. Eerkens y H. Barnard, eds. *Theory and Practice of Archaeological Residues Analysis*. BAR International Series 1650. Oxford: Archaeopress. Pp. 77-89.

Martínez-Martínez, A., 2002. *Esteroles*. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. P. 37

Maza-Erice, P.A. 2006. Los olmecas: un enfoque alternativo. Universidad Nacional de Cuyo. Ciudad Mendoza, Argentina. P. 41

RAE. 2014. Fogón. [En línea] Disponible en: <http://www.rae.es/> (Último acceso 17 de noviembre de 2014)

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

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

Rouessac, F. y Rouessac, A. 2003. *Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas*. 5ª Edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. P. 464

Symonds, S., Cyphers, A. y Lunagómez, R. 2002. *Asentamiento prehispánico en San Lorenzo Tenochtitlán*. Vol 2. UNAM, Instituto de Investigaciones Antropológicas. Ciudad de México, México. P.187