

Trabajo Fin de Grado

Determinación y cuantificación de alcanos en muestras arqueológicas de Cueva Pintada de Gáldar

Carla Hernández Gaspar



Curso 2017-2018



Departamento de Química
Universidad de La Laguna

AUTORIZACION

Luis Rafael Galindo Martín, Profesor Titular de Química Analítica de la Universidad de La Laguna, y **Caterina Rodríguez de Vera**, Responsable del laboratorio de láminas delgadas del AMBILAB (Laboratorio de micromorfología y biomarcadores arqueológicos) de la Universidad de La Laguna.

INFORMAN:

Que D^a. **Carla Hernández Gaspar**, alumna de Química de la Universidad de La Laguna, ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo de Fin de Grado en Química con el título **"Determinación y cuantificación de alcanos en muestras arqueológicas de Cueva Pintada de Galdar"**

Revisado el presente trabajo, autorizamos su presentación para que proceda a su lectura y defensa pública para optar al Grado en Química.

San Cristóbal de La Laguna a tres de septiembre de dos mil dieciocho.

Fdo: Luis Rafael Galindo Martín

Fdo: Caterina Rodríguez de Vera

Agradecimientos

- Ahora que culmino esta etapa de mi vida y miro hacia atrás veo que no he estado sola, grandes personas han estado a mi lado apoyándome y no dejándome rendir por todo ello quiero agradecer a:
- Todos y cada uno de los profesores que han estado en el camino tanto los buenos como los malos, ya que ahora me doy cuenta de que todos me enseñaron algo y no solo química. En especial quiero agradecer a Luis Rafael Galindo Martín, a María Jesús Sánchez Sánchez y a Venerando González Díaz ellos me demostraron que no solo somos un número y que en este camino teníamos en quien apoyarnos en los momentos que no sabíamos cómo seguir, gracias.
- A mi familia, no se para quien ha podido ser más dura esta carrera, para ellos o para mí, pero sí sé que nunca han dejado de confiar en mí y de animarme para que cumpliera mis metas. En especial quiero agradecerle a mis padres y a mi abuela porque aunque muchas veces no entendieran nada de lo que les decía me seguían escuchando y cuando había que mirar una nota todos sufríamos juntos, gracias.
- A mis amigos, esos que en todo momento me han hecho entender que la vida no son solo formulas y que hay que disfrutar de cada momento, pero que en los malos ratos no han dudado en ayudar y estar ahí para consolar y decir que yo podía, gracias.
- A Jesús González Álvarez por aguantarme cada día, que épocas de exámenes no es tarea fácil, pero además siempre conseguía hacer que viera todo desde otro punto de vista y sobretodo que jamás me rindiera, gracias.
- Y por último pero no menos importante a todo el AMBILAB y todos los que han estado cada día ayudándome a que este trabajo fuera posible, gracias a ellos he entendido que la química no es solo un laboratorio, que tiene mil aplicaciones y que con ella avanza el mundo. En especial agradecer a Caterina Rodríguez de Vera y Antonio Vicente Herrera Herrera por la paciencia y la atención recibida, gracias.

Resumen

En el presente trabajo se ha realizado un estudio de muestras de sedimentos pertenecientes a la Cueva Pintada de Gáldar, en la isla de Gran Canaria; utilizando para ello cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. La realización de este estudio pretende confirmar algunas de las teorías observadas a través de la micromorfología y, además, afirma la necesidad de la colaboración entre químicos, biólogos, geólogos, historiadores y arqueólogos para conseguir profundizar en el estudio de los usos y costumbres en la vida de nuestros antepasados.

Abstract

The aim of this work consists on the study of a batch of samples belonging to Cueva Pintada de Gáldar site, placed in Gran Canaria island. Samples were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer. Our results allow us to confirm some of the theories proposed previously by the archaeologists in their micromorphology studies. On the other hand, this study also shows that the collaboration between chemists, biologists, geologists, historians and arqueologists is necessary to know more about the customs and habits of our ancestors.

Índice

	Páginas
1. Introducción	1
1.1. Importancia de la Química Analítica en la Historia.	1
1.2. La Arqueología y su sinergia con la Química Analítica.	2
1.3. Biomarcadores	4
1.4. Alcanos	7
1.5. Cueva Pintada de Gáldar	9
2. Objetivos	12
3. Parte experimental	13
3.1. Patrones y disolventes	13
3.2. Material	13
3.3. Instrumentos y aparatos	14
3.4. Software	14
3.5. Procedimiento experimental	14
4. Resultados y discusión	25
4.1. Optimización del método de análisis	25
4.2. Calibrado	25
4.3. Detección y cuantificación de muestras	28
5. Conclusiones	38
6. Referencias	39

Abreviaturas

ACL: Longitud media de cadena de carbono

Paq: Proporción de plantas acuáticas

CPI: Índice de preferencia de carbono

CG-MS: Cromatografía de gases-masas

DCM: Diclorometano

CPG: Cueva Pintada de Gáldar

UE: Unidad estratigráfica

AMBI Lab: Laboratorio de Arqueología Micromorfológica y Biomarcadores

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

UDQ: fuera de rango de cuantificación

1. Introducción

1.1. Importancia de la Química Analítica en la Historia.

La química es la ciencia que estudia la composición, la estructura y las propiedades de la materia, así como las mutaciones que esta experimenta en las reacciones químicas y su relación con la energía.^[1]

Esta ciencia ha estado presente en la historia de la humanidad, puesto que aún sin saberlo, nuestros antepasados ya la usaban para transformar el barro en cerámica, teñir cuero o para crear ungüentos como medicinas; y también en algo tan sencillo como hacer fuego.^[1] Es posible que los egipcios ya conociesen y empleasen procesos químicos para la obtención de metales preciosos, aunque los primeros tratados de Alquimia fueron escritos por griegos, que llegaron incluso a representar sistemas de destilación. Posteriormente los árabes perfeccionaron técnicas y sistemas. La primera referencia a la palabra Química como tal aparece en un tratado del matemático y astrónomo Julio Firmico Materno, en el que recomendaba el estudio de esta disciplina a los nacidos bajo el signo de Saturno (336 D.C),^[2] aunque no fue hasta el s. XVII que Robert Boyle denominó a esta ciencia como Química y la describió como un método para adquirir nuevos conocimientos, diferenciándola de otras disciplinas a las que había estado ligada. A partir de este momento la Química buscó, como toda ciencia experimental, el “Cómo” en lugar del “Por qué”.^[1] Boyle contribuyó enormemente al desarrollo de la química analítica y a él se le debe el uso del término análisis tal y como hoy se entiende.^[2]

Inicialmente, la química utilizaba la gravimetría como herramienta principal de la química analítica cuantitativa; pero durante el s. XVIII, el rápido crecimiento industrial conllevó un gran desarrollo de los métodos analíticos, sobretodo en la industria metalúrgica. También en este siglo comienza a surgir un marcado interés por el análisis de los gases, cambiando la percepción de que todo era “aire” o distintos tipos de éste. Justamente en esta etapa es cuando Bergman diferencia la Química Analítica de otras disciplinas de la Química. Ya en el s. XIX aparece el análisis volumétrico, empleado principalmente en el sector textil. No obstante, el mayor desarrollo de los métodos y técnicas analíticas vienen marcadas por los rápidos avances científicos y tecnológicos precipitados por la Segunda Guerra Mundial. Los años siguientes a la posguerra

presenciaron una gama más amplia de técnicas analíticas para el estudio del pasado, incluidos análisis de rayos X, microscopía electrónica, análisis de activación de neutrones y espectrometría de masas, lo que ayudó a la profundización en el estudio de la formación de moléculas, fórmulas y los organismos más complejos. La industria de la química se expande con la creación de nuevos productos, materiales y fármacos que ayudan a la mejora de la calidad de vida de las personas. La diversidad de técnicas y aplicaciones que presenta la Química Analítica sirven de apoyo a la generación de conocimiento por parte de otras disciplinas tales como la Medicina, la Geología y cómo no, la Arqueología.

1.2. La Arqueología y su sinergia con la Química Analítica.

Renfrew y Bahn afirman en su trabajo llamado Arqueología, Métodos y Prácticas que "La arqueología se ocupa de estudiar una gran variedad de experiencias de las sociedades pasadas: desde cómo se organizaron en grupos sociales y explotaron sus alrededores; hasta otras cuestiones como qué comieron, hicieron y creyeron; cómo se comunicaron y por qué se produjeron cambios en dichas sociedades".^[3] Las inferencias sobre las sociedades pasadas se hacen a partir de las pruebas recuperadas en las excavaciones arqueológicas. A veces, estas pruebas se obtienen en forma de artefactos o estructuras conservadas (es decir, productos directos de la actividad humana), aunque también se puede obtener información, por ejemplo, de los restos de insectos (los cuales pueden señalar condiciones ambientales y ecológicas). Incluso en ocasiones, las características geológicas del propio yacimiento pueden aportar información; ya que establecen un contexto en el cual se han desarrollado las actividades que se investigan. Este tipo de estudios arqueológicos basados en el estudio de evidencias requieren el uso de aproximaciones científicas que aporten datos. La aplicación de estos métodos científicos ha permitido, por ejemplo, establecer antiguas rutas comerciales del Imperio Romano, mediante la correlación de fragmentos obtenidos en un determinado yacimiento con otros de similares características localizados en otros.^[4] Otro ejemplo de esta aplicación establece la relación entre los contextos socioeconómicos de ciertas ciudades a través de los huesos de animales encontrados en el yacimiento.^[5]

Según estos principios, sin las pruebas obtenidas en los yacimientos, no podríamos obtener las respuestas a las preguntas planteadas en la labor de reconstrucción del comportamiento de las sociedades pasadas. Es por ello que existe un fuerte requisito

moral y práctico para extraer la máxima información de los restos materiales recuperados durante cualquier investigación arqueológica. De vital importancia en esta labor es la aplicación de la Química Analítica a la hora de aportar los métodos instrumentales que permitan la detección y cuantificación de compuestos inorgánicos y orgánicos. Además, recientemente, se ha implementado el uso de técnicas para la medición de abundancias isotópicas en una gran variedad de elementos. La relación entre la Química Analítica y la Arqueología no es nueva, se conocen una cantidad importante de historias publicadas sobre el análisis científico aplicado al estudio de los pueblos y materiales del pasado. Caley (1773-1857) en diversos trabajos ya resume las primeras aplicaciones de la Química a la Arqueología; también Trigger (1937-2006) presenta una visión general de la Arqueología y las ciencias físicas y biológicas.

Otros ejemplos de investigadores que aunaron ambas disciplinas fueron Martin Heinrich Klaproth (1743-1817) y Humphry Davy (1778-1829). El primero de ellos fue un farmacéutico conocido por haber descubierto el uranio, el zirconio y el cerio y dar nombre a otros tres elementos. Este prodigioso científico estudió a través de la gravimetría la composición de aleaciones de cobre en muestras griegas y en monedas romanas además de una serie de objetos de metal y algunas piezas de vidrio romano. El segundo fue el descubridor del N_2O , de la naturaleza del cloro gaseoso y además el inventor de la lámpara de seguridad de los mineros. También tuvo un papel muy importante en la Química Arqueológica ya que realizó investigaciones sobre los pigmentos antiguos, recogidos por él mismo, en las ruinas de los baños de Livia y de restos de otros palacios y baños de la antigua Roma y Pompeya.^[1]

Posteriormente, el desarrollo de técnicas de medición instrumentales como la espectroscopía de emisión óptica entre los años 1920 y 1930 permitió la implementación de nuevas técnicas en la investigación arqueológica, más concretamente a la hora de comprender la tecnología empleada en la metalistería de La Edad del Bronce Europea, mediante el estudio de la secuencia de aleaciones utilizadas. Más tarde, en la década de los 50 se planteó un cambio de paradigma en la Arqueología, pasando a ser la “Nueva Arqueología”. Esta nueva filosofía pretendía no solo describir las acciones humanas pasadas si no a explicar por qué, cómo y con qué. Para ello, se tenían en cuenta la Química Analítica y la Antropología. Este cambio de paradigma jugó un papel importante a la hora de aplicar el método científico en la Arqueología,

siendo crucial el análisis químico de los artefactos hallados a la hora de estudiar ya no sólo los procesos interculturales sino también intraculturales.

El análisis de materiales orgánicos, especialmente el ámbar, jugó un papel importante en el desarrollo de la Química Arqueológica en el siglo XIX, pero esto cambió una vez llegada la edad de oro, en la que los arqueólogos se empezaron a fijar más en los artefactos inorgánicos tanto de piedra natural como materiales sintéticos como la cerámica, metales y/o el vidrio. La razón de este giro radica en que este tipo de materiales son más duraderos en el registro arqueológico y además coincide con un amplio desarrollo de métodos instrumentales para el análisis de compuestos inorgánicos. Hoy en día los componentes orgánicos vuelven a tener mayor peso en los estudios arqueológicos; materiales naturales como las ceras y resinas, los restos humanos como huesos, proteínas, lípidos, ADN. Para llevar a cabo este tipo de estudios se requiere aplicar metodología empleada en las áreas de Química, Biología Molecular y Bioquímica; pero también resulta importante aplicar los conocimientos de la Geoquímica Orgánica que se encarga del estudio de la supervivencia a largo plazo de una amplia gama de biomoléculas.^[6] Antiguamente se pensaba que la preservación de moléculas orgánicas era mucho más complicada, y que solo se daba en lugares con climas extremos o momificaciones. Hoy en día, con el avance obtenido en las técnicas analíticas y la alta sensibilidad de las mismas, el estudio de compuestos orgánicos no presenta mucha dificultad, por lo que los avances en Química Analítica son cruciales en el desarrollo de nuevas líneas de investigación en Arqueología.

1.3. Biomarcadores

Los biomarcadores o marcadores biológicos, son compuestos químicos (lípidos, proteínas, carbohidratos, oxalatos, etc.) cuya presencia o ausencia caracteriza a un conjunto, un grupo reducido o a un único tipo de biota. El estudio de estos compuestos permite saber si una muestra contiene restos de origen animal o vegetal. Incluso si se detecta la presencia de biomarcadores específicos (exclusivos de algunas especies), se podría indicar qué tipo de biota hay en una muestra concreta.^[7]

Estos compuestos son herramientas de utilidad ya que se conservan durante mucho tiempo y, gracias a esto, presentan un amplio rango de aplicación. El uso de los

biomarcadores en el marco de la Arqueología ha supuesto un gran avance, sobretodo el estudio de los biomarcadores lipídicos, ya que son uno de los principales reservorios de carbono orgánico en todos los organismos vivos. Los lípidos actúan como fuente de almacenamiento de energía (triglicéridos), constituyentes de las membranas biológicas (fosfolípidos) o como componentes estructurales (por ejemplo, en las ceras cuticulares de todas las plantas superiores) y una de sus características principales es que son insolubles en agua, lo que favorece que permanezcan durante más tiempo en el lugar donde fueron depositados.^[8] En el caso de las ceras epicuticulares vegetales; éstas están compuestas principalmente por compuestos alifáticos de alto peso molecular: hidrocarburos alifáticos, alcoholes y ácidos carboxílicos.^[9] Estos compuestos suelen preservarse frecuentemente en el registro arqueológico, en especial en los artefactos cerámicos, ya que durante los procesos de cocción, almacenamiento y preparación de alimentos y bebidas a los que son sometidos durante su vida útil, impregnan las paredes de las vasijas, conservándose en las mismas.^[10] El análisis de los biomarcadores lipídicos, en conjunto con otros *proxies* como el polen o las diatomeas, sirven además de gran ayuda en las reconstrucciones paleoecológicas, paleoclimáticas y paleogeográficas. Estas reconstrucciones resultan de gran utilidad a la hora de realizar interpretaciones sobre los hábitos y costumbres de los habitantes de un yacimiento arqueológico, ya que los recursos que emplearon estuvieron sujetos a estas condiciones.

En la actualidad, el estudio de biomarcadores para la reconstrucción de la historia paleoecológica y paleoclimática de diversas zonas está bien caracterizado en líneas generales, y aunque existen pequeños detalles que consensuar, existen numerosas publicaciones al respecto que pueden servir de referencia a estudios arqueológicos de contextos similares. Un ejemplo de ello es el estudio realizado en las inmediaciones de Chaona (Meseta de los Loess, China) a partir del estudio de biomarcadores en muestras pertenecientes a una sección estratigráfica. A lo largo de esta sección se encontraron variaciones en la distribución de n-alcános y n-alcáno-2-onas. A partir de estas distribuciones, se consiguió distinguir la presencia de árboles y pastos en distintas épocas, lo que permitió distinguir la existencia de cuatro fases evolutivas climáticas.^[11]

Así pues, a pesar de que la materia orgánica contenida en el sedimento constituye menos del 1%, este pequeño porcentaje es capaz de revelar mucha

información. En Arqueología hay un gran número de biomarcadores que aportan información, pero la mayoría de restos arqueológicos han estado sometidos a procesos de degradación, lo que hace que no se conserven todos los tipos de biomarcadores. Los más empleados en Arqueología aparecen en la Figura 1:

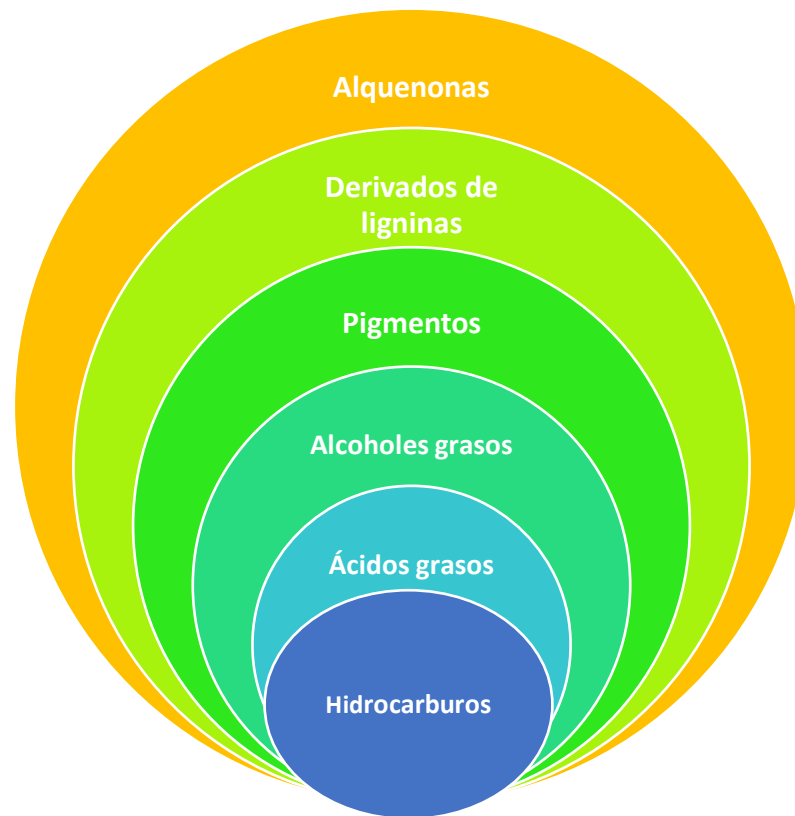


Figura 1. Diagrama de biomarcadores

De todos ellos, los hidrocarburos y los ácidos grasos son los biomarcadores que mejor resisten a la degradación tanto ambiental como antropogénica, y entre estos dos tipos, son los primeros los que mejor resisten el paso del tiempo. Puesto que los hidrocarburos son los más resistentes a la degradación, cabe esperar que puedan encontrarse en mayor concentración en muestras de sedimentos. Así pues, los hidrocarburos saturados son los principales indicadores de materia orgánica en los sedimentos. No obstante, existe un grupo de compuestos denominados n-acilos, conformado por algunos derivados de hidrocarburos, que son de interés como biomarcadores. Los compuestos que conforman este grupo son capaces de preservarse de manera diferente en el tiempo. La capacidad de resistencia a la degradación de los mismos sigue el patrón de la Figura 2: ^[12]



Figura 2. Diagrama sobre la conservación de biomarcadores en los sedimentos

En la Arqueología los más usados son los alcanos, y en menor medida los alcoholes y los ácidos alcanoicos. Por otra parte, los triterpenoides pentacíclicos se utilizan con frecuencia para caracterizar las fuentes de materia orgánica sedimentaria dado que son compuestos comunes en las plantas superiores.^[13] Los esteroles también son utilizados como indicadores de las fuentes de aporte de materia orgánica (alóctona, autóctona y antropogénica) y de las condiciones que tienen lugar durante la diagénesis.^[14]

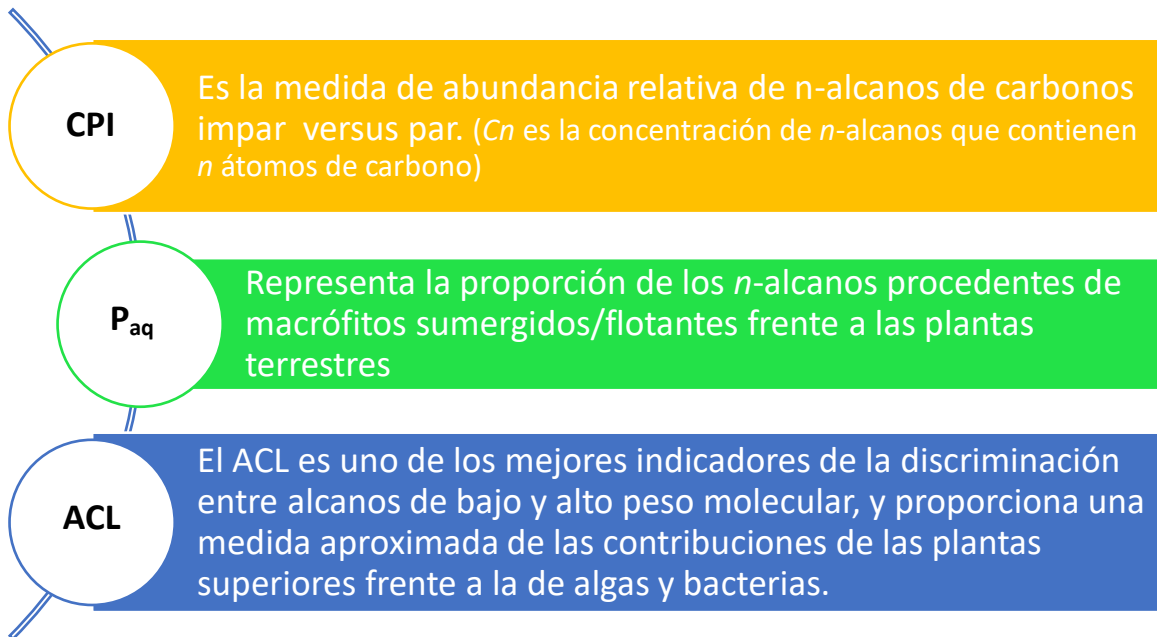
1.4. Alcanos

Los n-alcanos son compuestos orgánicos del grupo de los n-acilos más importantes y como ya se ha explicado, se determinan con mayor frecuencia porque son los que menos se degradan. Principalmente se derivan de las ceras epicuticulares de las especies vegetales y en este punto es importante resaltar que hay especies vegetales que presentan un determinado perfil de n-alcanos, lo que hace que sean más fáciles de identificar. Es complicado conocer todos los perfiles de alcanos que existen en cada especie, aunque este tipo de investigaciones están en auge, pero generalmente se puede admitir que las algas y las bacterias fotosintéticas están dominadas por n-alcanos de cadena corta (C_{15} , C_{17} , C_{19}).^[15] Los macrófitos sumergidos y flotantes contienen gran proporción de n-alcanos de cadena media (C_{21} , C_{23} y C_{25}),^[16] mientras que los macrófitos emergentes y las plantas vasculares terrestres presentan n-alcanos de cadena larga (C_{27} , C_{29} y C_{31}).^[17]

A través del perfil de alcanos que presenta una muestra, además, se puede deducir si ha sido expuesta a un proceso de combustión, puesto que se obtendrán principalmente alcanos pares. La razón de este comportamiento radica en que los alcanos de longitud impar tienen puntos de fusión ligeramente menores que los esperados, comparados con

los alcanos de longitud par, ya que los alcanos de longitud par en fase sólida presentan una estructura más compacta y mejor organizada (es decir, es necesario aplicar mayor energía para romperse), mientras que los alcanos de longitud impar presentan un empaquetamiento menos compacto y requiere menor energía para romperse. Por otro lado, si se observa una predominante tendencia de números impares frente a los pares puede deberse también a la descarboxilación de n-alcanos a partir de ácidos grasos con un número de ácidos grasos que se incrementa en uno.^[18]

En el estudio de los alcanos como biomarcadores con el objeto de realizar análisis paleoambientales hay que tener en cuenta no sólo la abundancia de los distintos alcanos dominantes, sino la relación entre todos los alcanos detectados.^[19] Para ello, se utilizan tres índices principales:



$$CPI = \frac{\sum \text{impares } C_n}{\sum \text{pares } C_n}$$

$$P_{aq} = \frac{C_{23} + C_{25}}{C_{23} + C_{25} + C_{29} + C_{31}}$$

$$ACL = \frac{\sum n \cdot C_n}{\sum C_n}$$

Los valores de CPI varían dependiendo del tipo de sedimento arqueológico estudiado. Así, de manera general se puede afirmar que los n-alcanos derivados de las plantas terrestres tienen valores de $CPI > 5$,^[20] en cambio los derivados de bacterias y algas presentan valores próximos a 1.^[15] No obstante, estos valores no son fijos y hay macrófitos con valores de CPI entre 0,9 y 27,3;^[20] además es destacable que los valores de CPI varían incluso dentro de la misma especie en condiciones climáticas

diferentes.^[21] El CPI también es indicativo de la preservación de la materia orgánica. Las cadenas más cortas de n-alcanos son más propensas a la degradación que las más largas, debido a la diagénesis y a la degradación bacteriana. En este caso los valores de CPI disminuyen gradualmente hasta 1.^[31] Se debe tener en cuenta que generalmente los valores de CPI aumentan en condiciones climáticas frías y secas en cambio en lugares húmedos y calurosos los valores de CPI son más bajos debido a la actividad microbiana.^[22] Hay que dejar claro que estos valores no siempre son del todo correctos debido a que nunca se conoce por completo las condiciones a las que ha sido sometida la muestra antes de ser tomada.

El ACL nos permite conocer la importancia que tiene los alcanos de bajo y alto peso molecular para poder proporcionar una medida sobre las posibles contribuciones que pueden tener para las algas frente a las plantas superiores, este valor presenta variaciones respecto a la climatología a la que han sido expuestos los analitos de interés.

El Paq es un dato que ayuda a conocer la que proporción de macrofitos sumergidos y flotantes hay frente a las plantas terrestres, dependiendo de los valores que se obtenga se puede conocer la procedencia de los analitos que se intentan cuantificar lo que es muy provechoso a la hora de obtener resultados válidos para proporcionar conclusiones, de manera que se unimos los tres parámetros se obtendrían unos datos concluyentes a la hora de dar un veredicto.

1.5. Cueva Pintada de Gáldar

El conjunto arqueológico de Cueva Pintada se encuentra situado en el interior de Gáldar, al noroeste de la isla de Gran Canaria. Es uno de los yacimientos arqueológicos más importantes de Canarias cuyo descubrimiento fue propiciado en 1862 por la realización de trabajos agrícolas sobre el cultivo de tuneras para la cría de cochinillas, aunque no es hasta 1873 que se le pone fecha al hecho, cuando José Ramón Orihuela accedió a la cámara por una pequeña rendija descubriendo así la cueva que da nombre al yacimiento. Hoy en día tiene el reconocimiento de Parque Arqueológico y ocupa un espacio de 5000 m².

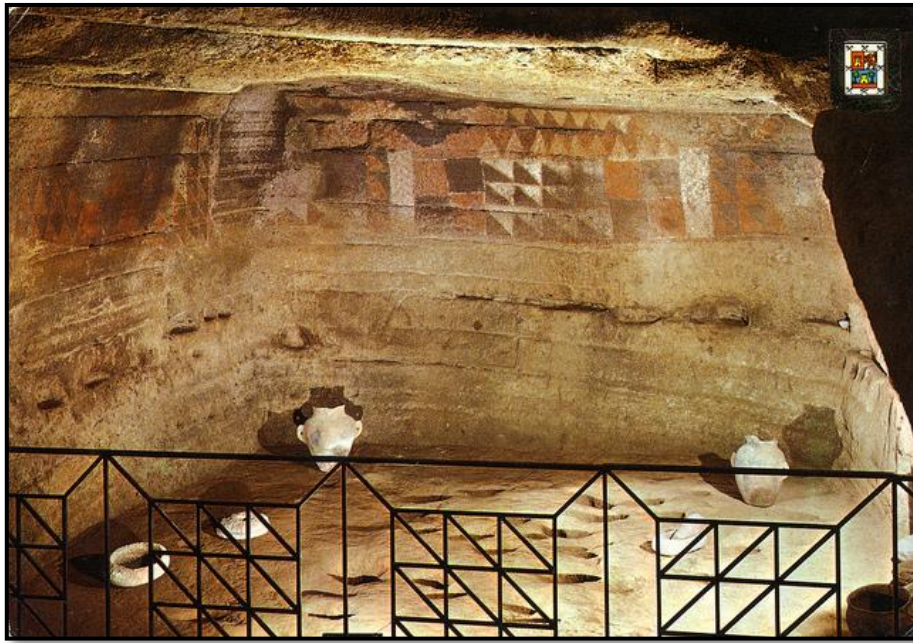


Figura 3. Cueva Pintada de Gáldar

Los trabajos que se han realizado entre 1987 y 2002, han puesto de manifiesto que existió una gran ocupación prehispánica que rodeaba por completo la Cueva Pintada. Aunque se han visto dañadas algunas de las construcciones debido a la repoblación castellana, varias zonas de extracción de cantos y sucesivos acontecimientos agrícolas presentan un aceptable estado de conservación. Lo que sí está claro según los estudios geoarqueológicos es la existencia de dos fases totalmente diferenciadas en la evolución de los habitantes prehispánicos. Los estudios de Carbono 14, luminiscencia y geomagnetismo permiten situar de manera coherente en la historia el inicio de la presencia humana en esta zona en torno al siglo VII. Posteriormente hubo un lapsus de tiempo en el que no se conoce actividad en la zona poblada y luego parece que se dio un repunte abundante de repoblación. Este lapsus se sitúa, no de forma concreta, entre el siglo XIII y el siglo XIV.

A pesar de estos estudios, aún en la actualidad siguen existiendo numerosas incógnitas sobre los primeros pobladores del archipiélago canario. La principal es el momento concreto de la colonización, aunque los historiadores coinciden en ubicarla a mediados del primer milenio a.C. procediendo del norte del continente africano. Otra incógnita es cómo llegaron a Canarias, ya que se sabe que la población canaria desconocía el arte de la navegación. Entre las hipótesis barajadas se plantea que

vinieron en distintas oleadas traídos por otros pueblos que sí conocían el arte de la navegación, o que llegaron por ellos mismo usando medios rudimentarios de navegación. Lo que sí parece evidente es que estos grupos humanos se adaptaron con facilidad a las islas y crearon una densidad de población significativa; por ello, por toda la isla de Gran Canaria se localizan poblados de casas o cuevas. Además, sorprende el hecho de la existencia de cuevas artificiales creadas para el ganado o espacios ceremoniales.^[23]

2. Objetivos

En la actualidad, los biomarcadores suponen un punto de inflexión en la adquisición de información en entornos arqueológicos; por ello, el presente trabajo pretende conocer más a fondo la vida de nuestros antepasados con ayuda de estos compuestos.

El objetivo principal de este trabajo radica en el estudio de los alcanos presentes en muestras pertenecientes a la Cueva Pintada de Gáldar, con el fin de poder hacer una reconstrucción paleoambiental en dos viviendas distintas del entorno. Por medio de este estudio se pretende corroborar el análisis micromorfológico previo, realizado en algunas de las muestras, ya que se ha observado la posibilidad del uso de lechos vegetales a modo de alfombras; siendo estos, restos vegetales desconocidos.^[24]

Como objetivos secundarios se plantean:

- ✓ Realizar una búsqueda bibliográfica actualizada de las metodologías de análisis empleadas en la determinación de alcanos en sedimentos.
- ✓ Determinación del efecto matriz de un sedimento control, para conocer el efecto causado por el mismo en los alcanos que se desean caracterizar.
- ✓ Hacer uso de la CG acoplada a un detector de masas para determinar y cuantificar los alcanos presentes.

Una vez desarrollado nuestro estudio sobre los biomarcadores, se podrá conocer más en profundidad lo expuesto.

3. Parte experimental

3.1. Patrones y disolventes

- Diclorometano (Cas: 75-09-2, Scharlau, 99.9% para análisis de residuos GC)
- Metanol (Cas: 67-56-2, Honeywell I Riedel-de Haën, 99.9% para HPLC)
- Acetato de etilo (Cas: 141-78-6, Sigma-Aldrich, 99.7% para HPLC)
- N-Hexano (Cas: 110-54-3, Honeywell I Riedel-de Haën, 97% para HPLC)
- Estándar de calibrado: Alcanos de C8 al C40, pureza entre 99.9-90.1%, concentración entre 500.0-500.8.(Supelco)

3.2. Material

- Gel de Sílice (Sigma Aldrich, poro 60Å, 70-260 mesh)
- Arena de cuarzo (Sigma Aldrich, 50-70 mesh tamaño de partícula)
- Pipetas Pasteur
- Lana de vidrio (ovillos)
- Matraces Erlenmeyer (100 mL y 200 mL)
- Vasos de precipitado (50 mL, 100 mL y 250 mL)
- Matraz Kitasato (1000 mL)
- Viales (60 mL y 10 mL)
- Insertos (300 µL)
- Viales GC-MS (1.5 mL)
- Probetas (10 mL, 100 mL y 400 mL)
- Jeringa Hamilton (100 µL y 500 µL)
- Embudo Büchner
- Filtros de fibra de vidrio (GE Healthcare Life Sciences, Whatman Glass microfiber filters, 100mm)
- Pinzas
- Tijeras
- Espátula
- Elevador

- Mortero de ágata
- Papel aluminio.

3.3. Instrumentos y aparatos

- Evaporadores:
RapidVap. *Vortex Evaporator. Labconco* (Figura 5)
Organomation. *N-Evap 112*
- Ultrasonido. *Ultrasonic Cleaner USC-TH.VWR*
- Estufa. *Nabertherm TR-240*
- Lavavajillas. *Smeg.GW4050*.
- Centrifuga. *Mega star 1.6. VWR* (Figura 6)
- Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrofotómetro de Masas. (Agilent 7890B GC acoplado a un Espectrofotómetro de Masas 5977A MSD con cuádruplo simple (Q) MS y una interface de impacto de electrones, equipado con un autosamplador automático y un inyector multimodo (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) (Figura 9)

3.4. Software

- MassHunter Workstation (Agilent Technologies)
- Qualitative Analysis of MassHunter Acquisition Data B.07.00
- Microsoft Office Excel 2010

3.5. Procedimiento experimental

El procedimiento seguido se divide en varias partes, todas de gran importancia.

3.5.1. Recogida de muestras

Las muestras analizadas proceden de dos viviendas del entorno de Cueva Pintada de Gáldar. Los sedimentos que componen este yacimiento son, en su mayoría, de tipo arcilloso.

A la hora de proceder a la recogida de muestras, lo primero que se debe hacer es esterilizar todo el material que se vaya a utilizar, en este caso, papel de aluminio y espátulas. En todo momento se deben utilizar guantes para evitar contaminaciones. Con la espátula se elimina el sedimento superficial, que puede estar sometido a pisoteo, contaminantes, etc. Posteriormente con otra espátula se recoge el sedimento en papel aluminio, aproximadamente 10 g. La muestra se envuelve en el papel aluminio dónde se recogió y se refuerza, si es necesario, con otro papel de aluminio. Por último, se guarda en el interior de una bolsa con cierre tipo zip y se etiqueta con la información pertinente.

Las muestras deben guardarse en el congelador lo antes posible y sólo deben sacarse a la hora de proceder a su procesamiento.



Figura 4. Puntos de muestreo en el yacimiento de La Cueva Pintada de Gáldar

3.5.2. Obtención del extracto lipídico total

3.5.2.1. Pretratamiento

Para conseguir una buena extracción se debe de eliminar el agua presente en la muestra, ya que ésta puede interferir en nuestro proceso de extracción debido a que la muestra se trata con disolventes orgánicos ya que la fase de interés es la orgánica y no la acuosa. Por todo esto, se someten a secado en la estufa durante 48 horas a 60 °C.

Posteriormente se pesan 5 g que serán tratados en el mortero de ágata, eliminándose de esta manera todos aquellos trozos que superen los 2 mm

aproximadamente y que no puedan ser reducidos. Este proceso es importante para conseguir una buena homogeneización de la muestra y, por lo tanto, una mejor eficiencia en la extracción de los analitos.

3.5.2.2. Extracción

Se debe preparar una disolución de 450 mL por cada 60 g de muestra, esto se traduce en 40 mL para los 5 g tratados. La disolución empleada en la extracción es 9:1 DCM:MeOH (asegurándonos de que ambos disolventes se mezclan por completo) en otros artículos se hacen otras mezclas de solventes como una mezcla 2:1 DCM:MeOH [25] pero en nuestro caso decidimos usar este tipo de ya que para el tipo de muestras que tenemos este presenta mejores resultados.

Luego se adiciona a la muestras esta disolución y se trata con ultrasonidos durante 30 minutos (teniendo en cuenta en todo momento la temperatura, la cual no debe de pasar de 35°C). El siguiente paso es pipetear el sobrenadante, procurando no tomar nada de sedimento, pasándolo a los tubos de centrifuga.

El sobrenadante se somete a 10 minutos de centrifugación a 4700 rpm, mientras se prepara el filtro, que estará compuesto por lana de vidrio y papel filtro en el interior de una pipeta Pasteur. Para elaborar el filtro, se introduce una bola de lana de vidrio previamente tratada térmicamente, y se empuja con cuidado con la parte más fina de otra pipeta Pasteur. Luego se corta un trozo pequeño de filtro con unas tijeras, previamente tratadas con un disolvente polar y otro apolar, y se introduce con cuidado en la pipeta. Por último, se dan unos toques con el fin de eliminar los cristales sueltos de la lana de vidrio.



Figura 5. RapidVap, evaporador



Figura 6. Centrifuga

A continuación, se filtra el sobrenadante recogiendo en unos viales de 60 mL, que posteriormente se evapora a 40°C usando una corriente de nitrógeno (N₂) en el RapidVap. Cuando se haya evaporado casi todo se trasvasa a un vial más pequeño, para que sea más fácil de almacenar y se termina de evaporar.

El mismo procedimiento se repite dos veces más, uniendo todo el extracto orgánico en un vial, de esta manera aseguramos una buena extracción de los analitos de interés.

3.5.3. Obtención de los n-alcenos

En este paso nos aseguraremos de obtener una muestra con la mayor concentración de los analitos que nos interesan. Para ello se realizará cromatografía en columna de gel de sílice se separa en fracciones el extracto lipídico total de manera que a la hora de realizar el análisis con el cromatógrafo de gases obtendremos un mejor espectro de n-alcenos, evitando las interferencias que imposibiliten determinar y cuantificar los compuestos de interés.

3.5.3.1. Preparación de columnas de cromatografía

Es necesario el uso de lana de vidrio, 0,1 g arena y 1g de gel de sílice, todo previamente pirolizado. Como material necesitamos 5 pipetas Pasteur, pinzas y diclorometano.

Lo primero que debemos hacer es introducir en la columna (pipeta) una bola de lana de vidrio de manera que quede lo más horizontal posible. Para ello nos ayudaremos de las pinzas y de una pipeta Pasteur de tallo largo. Una vez introducida la lana de vidrio, se introduce arena de manera que forme una pequeña capa y por último se adiciona el gramo de gel de sílice. Es importante que todo quede lo más horizontal posible para una mejor separación. Cuando la columna ya está preparada, es momento de introducir la muestra. Para ello es necesario disolverla previamente en diclorometano (DCM) e introducirla en la columna de la manera siguiente: se añaden 9 gotas de la disolución y se deja secar durante

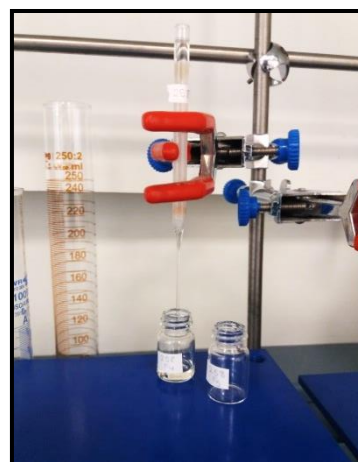


Figura 7. Elución de columna

unos 20 minutos. Luego se repite el proceso hasta terminar de adicionar toda la muestra. Por último, se deja secando la columna hasta el día siguiente.

3.5.3.2. Elución de columnas

Para este paso son necesarios 6 viales por muestra, 6 vasos de precipitado para las disoluciones, una probeta de 10 ml, una jeringa Hamilton y un elevador por muestra. Las disoluciones necesarias son: hexano; hexano: DCM (8:2); DCM; DCM: EtOAc (1:1); EtOAc y DCM: MeOH (7:3).

Lo primero que hay que hacer es calcular el volumen muerto de la columna, para ello hacemos pasar hexano a través de la columna añadiéndolo gota a gota por la parte superior de la columna hasta que caiga la primera gota por el otro extremo. En ese momento tomamos el volumen de hexano añadido y ese será el volumen muerto. Sabiendo el volumen muerto podemos calcular que cantidad se debe añadir de cada disolvente, según la siguiente tabla:

Disolventes	Volumen elución (mL)
Hexano	x 3/8 Vol.muerto
Hexano: DCM	x 2 Vol.muerto
DCM	x 2 Vol.muerto
DCM: EtOAc	x 2 Vol.muerto
EtOAc	x 2 Vol.muerto
DCM:MeOH	x 2 Vol.muerto

Tabla 1. Cálculo volumen muerto para cada uno de las muestras y disolventes.

A modo de ejemplo, si obtenemos un volumen muerto de 1.5 mL tendríamos la siguiente tabla de valores para los disolventes:

Disolventes	Ejemplo
Hexano	$(1.5 \times 3)/8 = 0.570\text{ml} = 570\mu\text{l}$
Hexano: DCM	$1.5 \times 2 = 3\text{ml}$
DCM	$1.5 \times 2 = 3\text{ml}$
DCM: EtOAc	$1.5 \times 2 = 3\text{ml}$
EtOAc	$1.5 \times 2 = 3\text{ml}$
DCM:MeOH	$1.5 \times 2 = 3\text{ml}$

Tabla 2. Ejemplo datos volumen muerto para cada uno de los disolventes

Y ese es el volumen que se debe adicionar de cada disolución preparada a la columna, para ello es adecuado utilizar las jeringas Hamilton.

Una vez se obtienen todos los datos necesarios procedemos a eluir (Figura 7) la columna, adicionando los disolventes en el orden expuesto, recogiendo así cada fracción por separado (Figura 8).



Figura 8. Recogida de analitos según fraccionamiento

Cada una de las fracciones se evapora en el Organomation para luego ser almacenada en la nevera.

3.5.4. Obtención de muestras para corrección del efecto matriz

Este paso es de importancia ya que el efecto matriz es el efecto que presentan todos los componentes de la muestra distintos al analito en la medida de una cantidad (de analito). A la hora de aplicar un método analítico, el efecto matriz se traduce en una diferencia de sensibilidad del mismo cuando se prepara un calibrado en un disolvente frente a uno preparado en el mismo entorno de la muestra.^[26] Por ello es necesario realizar este paso. El procedimiento que se debe realizar es el mismo que para las muestras, pero en este caso se pesan 50 g, lo que hace que todos los volúmenes sean mayores. Inicialmente se necesitan dos matraces con 25 g de muestra en cada uno, para ello debe ser homogenizada previamente. Luego se preparan 200 mL de la mezcla de disolvente para cada uno (180 mL DCM: 20 mL MeOH), se pasa por ultrasonido y se filtra con un embudo Büchner y un Kitasato, debido al tamaño de la muestra.

Es necesario el uso de ocho tubos de centrifuga para centrifugar la suspensión y ésta se realiza de dos veces (cuatro y cuatro). El resto del procedimiento es exactamente igual que para el resto de muestras.

3.5.5. Análisis CG-MS

Para la determinación y cuantificación se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 7890B GC acoplado a un espectrofotómetro de masas 5977A MSD con cuádruplo simple (Q) MS y una interface de impacto de electrones, equipado con un autosamplador automático y un inyector multimodo (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) es el usado en el experimento. Este está asociado con el software MassHunter Workstation (Agilent Technologies) que es el encargado del control del sistema del GC-MS.



Figura 9. Cromatógrafo de gases acoplado a un Espectrómetro de Masas

3.5.5.1. Condiciones de inyección

Las condiciones del cromatograma ya se habían elegido previamente, se tomó para la separación de analitos una columna capilar de silica (5% fenil)-metilpolisiloxano

(HP-5ms; 30 m x 0,25mm, 0,25 μ m, Agilent Technologies). La salida de la columna capilar estaba conectada a el MS por medio de una línea de transferencia con una temperatura de 280°C. Los niveles de helio en la columna fueron de 1 mL/min. Se realiza una rampa de temperatura en el cromatógrafo la cual comienza a 70°C durante 2 minutos luego sube 12°C/min hasta llegar a los 140°C y por último sube 6°C/min hasta alcanzar los 320°C en los que se mantiene 16 minutos. El cuadrupolo funcionaba con el modo barrido completo (m/z=40/580) la cuantificación es llevada a cabo tomando los iones con mayor intensidad (43,57,71 y 85 para alcanos; 67,95,81 y 245 para el estándar). Los compuestos son identificados mediante la comparación de los resultados con los de referencia (mezcla C₈-C₄₀ y 5- α -androstano) utilizando el espectro de masas NIST.

El detector de masas fue utilizado bajo las siguientes condiciones: la fuente de iones se ajustó a 230°C con una energía de ionización electrónica de -70eV y la temperatura del cuadrupolo se estableció a 150°C y por último la demora del solvente se programó a 6 minutos.

3.5.5.2. Calibrado de la matriz

Es necesario calibrar el aparato para poder obtener resultados óptimos y que posteriormente puedan ser útiles. Por ello se debe de realizar una curva de calibrado y en este caso con una matriz, ya que hay que tener en cuenta el efecto matriz en los resultados.

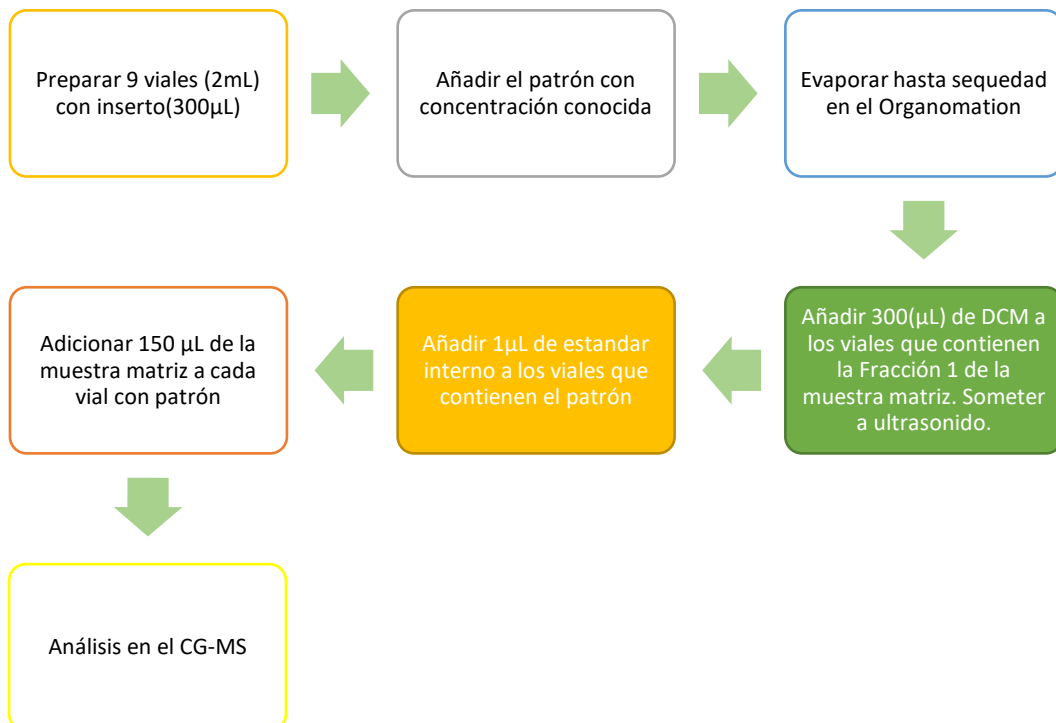
Para realizar la curva de calibrado se utiliza un estándar interno, el 5 α -androstano. Se elige utilizar estándar interno con el fin de evitar la falta de reproducibilidad en la señal o en las inyecciones. Al usar un estándar interno se debe representar el área dividida entre el área del estándar frente a la concentración.

Para realizar la curva de calibrado se eligió un rango de concentración de 0,5 ppm a 10 ppm. Éste es tan amplio porque al tratarse de muestras de origen reciente a escala geológica, pueden contener alcanos en concentraciones muy variadas, y con el fin de poder obtener resultados directos sin someterlos a dilución o concentración se ha optado por ampliar el rango de concentraciones de la curva de calibrado.

Concentración (ppm)	
Blanco	0
1	500
2	1.000
3	2.000
4	5.000
5	7.500
6	10.000
7	15.000
8	20.000
9	25.000

Tabla 3. Concentraciones utilizadas para la curva de calibrado

El patrón elegido es un estándar de calibración que contiene alcanos del C₈ al C₄₀ y el procedimiento llevado a cabo para realizar las curvas de calibrado es el siguiente:



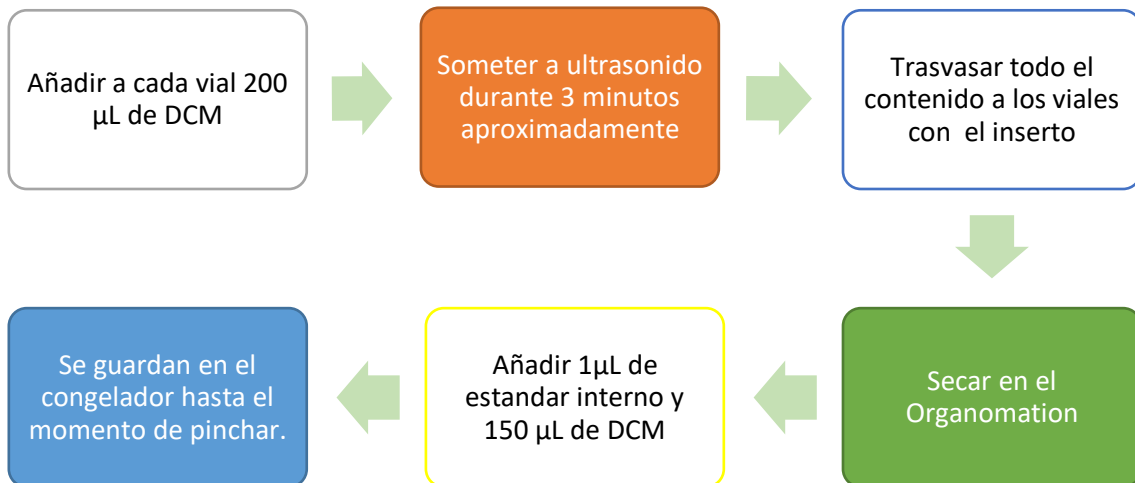
Esquema 1. Preparación de muestras para la realización del calibrado

Una vez obtenidos los resultados cromatográficos, se analiza el efecto de la matriz y se procede a la realización de las curvas de calibrado, que son la base para la cuantificación de los analitos de interés.

3.5.5.3. Detección y cuantificación de alcanos

Una vez preparadas las curvas de calibrado se procede a pinchar las muestras anteriormente extraídas y fraccionadas. En este caso sólo se utiliza la Fracción 1 ya que es la que contiene los analitos de interés en este caso. Figura 8

El procedimiento por el que deben pasar los analitos es el siguiente:



Esquema 2. Preparación de las muestras para inyección en el GC-MS

Una vez pinchadas las muestras en el cromatógrafo, se analizan los resultados y se comprueba la necesidad de diluir o concentrar alguna de las fracciones con el fin de intentar cuantificar picos cromatográficos detectados.

3.5.6. Limpieza del material

El material del laboratorio tiene distintos lavados dependiendo del tipo de material que sea.

3.5.6.1. Material volumétrico

- Se adiciona en el interior una disolución de agua y detergente (DERQUIM) al 2%. Se introduce en el ultrasonido durante 10 min.
- Se elimina el agua con jabón y se le añade agua del grifo, luego se deja durante 2 min en ultrasonido.
- Se enjuaga y luego se adiciona agua mili-Q. Se deja 10 min en ultrasonido.
- Se enjuaga con acetona y se deja secar.

3.5.6.2. Material de cristal no volumétrico

- Se coloca el material en el interior del lavavajillas, sin etiquetas ni marcas, las cuales han de ser borradas con anterioridad.
- Se activa el ciclo de lavado, sin temperatura específica.
- Luego se cambia a un ciclo sin secado, a una temperatura de 80°C.
- Todo el material es lavado con agua miliQ.
- Se guarda en estufa durante 1 hora a 120°C.
- Por último se pasa a una estufa de mayor temperatura, se mantiene durante 10 horas a 450°C.

4. Resultados y discusión

4.1. Optimización del método de análisis

El método empleado para la realización de este trabajo había sido previamente aplicado en el grupo de Micromorfología y Biomarcadores Arqueológicos (AMBI Lab) de la Universidad de La Laguna, por ejemplo, en muestras de referencia de origen vegetal quemadas a distintas temperaturas para la determinación de alcanos.^[29] Debido a los buenos resultados obtenidos, solamente se llevó a cabo la optimización del tiempo de duración de cada cromatograma, tal y como refleja la Figura 10 .

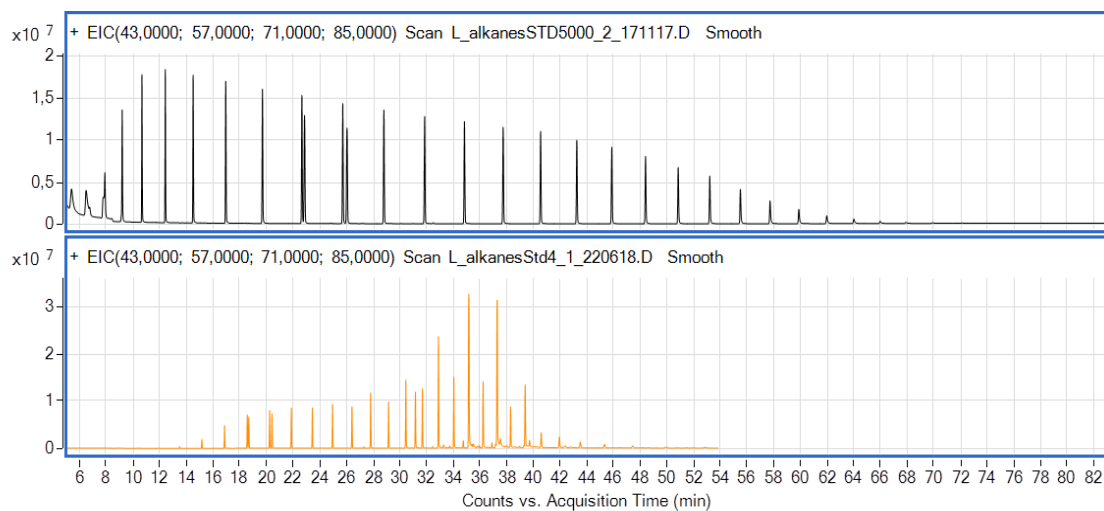


Figura 10. Cromatogramas comparativos de optimización de tiempo

Como se puede observar, se consiguió disminuir el tiempo de duración sin perjudicar a los resultados, ya que siguen saliendo unos picos finos y sin solapamientos, esto hizo posible una mejora del proceso y una ayuda a la hora de poder pinchar más muestras a lo largo del día.

4.2. Calibrado

El estudio de las interferencias de la matriz es necesario para poder interpretar los resultados de la manera más real posible, dado que la matriz es el conjunto de todas aquellas especies químicas que acompañan al analito en la muestra, estas son capaces de producir una variación de los resultados por la disminución o el aumento de la señal de los analitos y por cambios en la curva de calibrado.^[26]

En el apartado de procedimiento experimental se comenta la realización de una extracción de la muestra considerada como matriz y el empleo de la misma para realizar las curvas de calibrado. A partir de los datos obtenidos en este procedimiento, se realizó un gráfico en el que se expone el porcentaje de efecto matriz frente los n-alcenos de interés con el fin de ver el alcance del efecto matriz. Para obtener estos datos fue preciso realizar la media del área del estándar instrumental y la media del área del estándar de la matriz. Una vez obtenido, se restan ambas medias y se dividen entre la media del área del estándar de la matriz, multiplicando por cien este resultado. Una vez realizados los cálculos, se obtuvo el gráfico siguiente: ^[30]

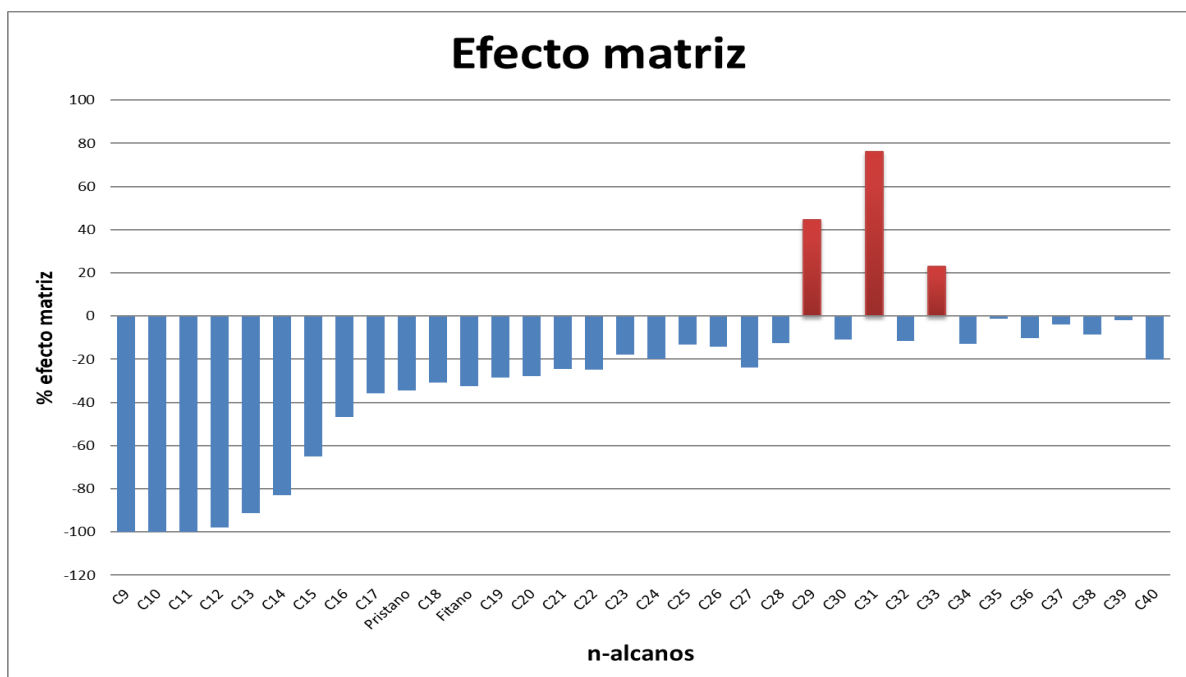


Gráfico 1. Porcentaje efecto matriz

El Gráfico 1 muestra dos colores, azul y rojo los cuales corresponden respectivamente a valores negativos y positivos. Como es visible abunda el color azul en la mayoría de los n-alcenos en estudio, exceptuando los n-alcenos C₂₉, C₃₁ y C₃₃ los cuales tienen valores positivos, por lo que se visualizan en rojo. Los valores negativos se traducen a la hora de obtener los resultados en que se va a producir una disminución de la señal dando lugar a valores menores en las concentraciones e incluso a la no obtención de los mismos, esto también se puede ver reflejado en la curva de calibrado ya que en los analitos de cadena corta disminuirán su concentración pudiendo no aparecer.

Una vez hecho el estudio del efecto matriz se procede a realizar las curvas de calibrado, las cuales presentan una forma parabólica debido al amplio rango de concentración utilizado, a continuación se ponen cuatro ejemplos de las mismas:

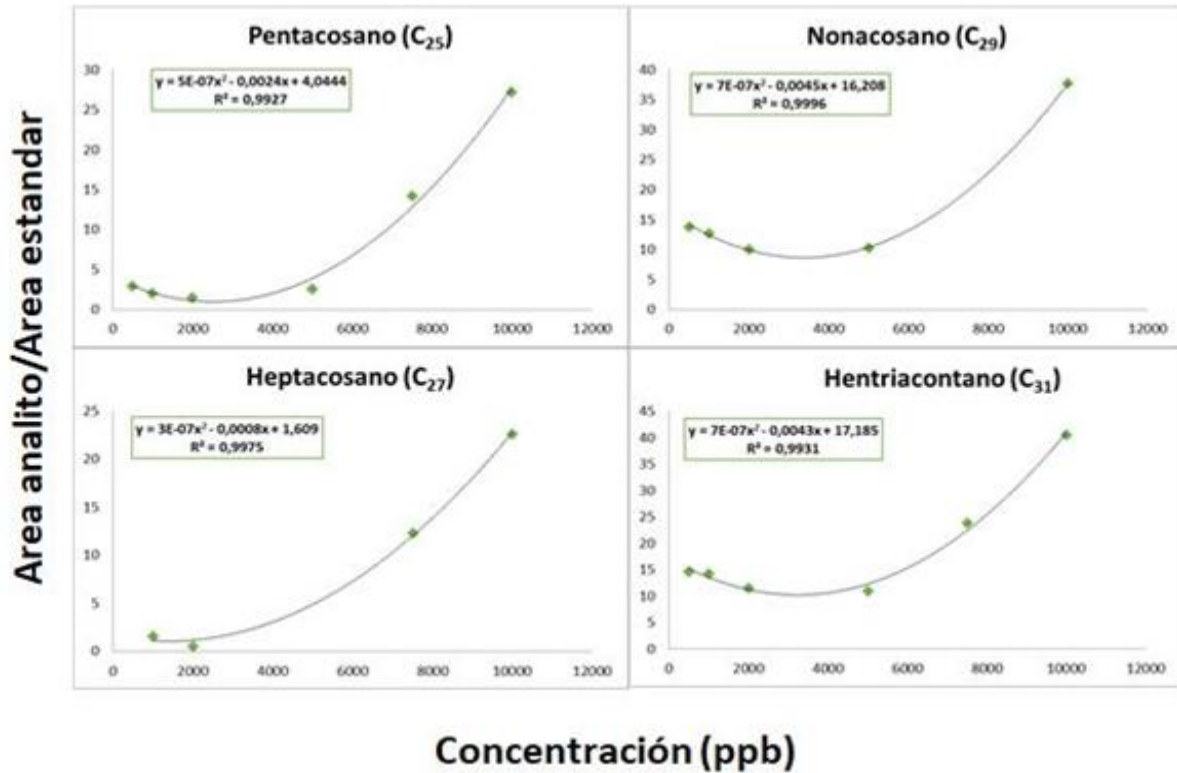


Figura 11. Curvas de calibrado de los cuatro n-alcenos más importantes

Una vez obtenidas todas las curvas de calibrados se pueden observar las ecuaciones de las mismas y los R^2 , además se realizó el cálculo del LOD y el LOQ, todo ello se muestra en la tabla resumen siguiente:

Analito	Rango de concentración($\mu\text{g/g}$)	Ecuación	R2	LOD($\mu\text{g/g}$)	LOQ($\mu\text{g/g}$)
C13	0,03-0,3	$y = 2 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0013x + 2,2895$	0,9992	0,00137	0,00455
C14	0,03-0,3	$y = 2 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0017x + 3,0503$	0,9937	0,00169	0,00565
C15	0,03-0,3	$y = 3 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0023x + 3,8147$	0,9915	0,00020	0,00068
C16	0,03-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0023x + 3,8876$	0,9945	0,00027	0,00090
C17	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0016x + 2,312$	0,9906	0,00068	0,00225
Pristano	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0016x + 2,3015$	0,9901	0,00072	0,00238

C18	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0016x + 2,2647$	0,9924	0,00036	0,00119
Fitano	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0016x + 2,2589$	0,9919	0,00039	0,00129
C19	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0016x + 2,3395$	0,9930	0,00120	0,00401
C20	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0017x + 2,4483$	0,9932	0,00068	0,00228
C21	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0017x + 2,6526$	0,9939	0,00100	0,00333
C22	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0018x + 2,6685$	0,9942	0,00039	0,00129
C23	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0021x + 3,38$	0,9949	0,00132	0,00440
C24	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0019x + 2,9537$	0,9946	0,00155	0,00517
C25	0,015-0,3	$y = 5 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0024x + 4,0444$	0,9927	0,00082	0,00273
C26	0,015-0,3	$y = 5 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0021x + 3,4426$	0,9944	0,00040	0,00133
C27	0,03-0,3	$y = 3 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0008x + 1,609$	0,9975	0,00100	0,00335
C28	0,015-0,3	$y = 5 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0025x + 4,3153$	0,9923	0,00263	0,00878
C29	0,015-0,3	$y = 7 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0045x + 16,208$	0,9996	0,00101	0,00337
C30	0,015-0,3	$y = 5 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0025x + 4,2388$	0,9934	0,00103	0,00344
C31	0,015-0,3	$y = 7 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0043x + 17,185$	0,9931	0,00203	0,00676
C32	0,015-0,3	$y = 4 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0022x + 3,7394$	0,9913	0,00049	0,00163
C33	0,015-0,3	$y = 3 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0013x + 4,6488$	0,9938	0,00260	0,00866
C34	0,015-0,3	$y = 3 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0014x + 1,9146$	0,9968	0,00013	0,00044
C35	0,015-0,3	$y = 2 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0012x + 1,7444$	0,9961	0,00144	0,00480
C36	0,015-0,3	$y = 2 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0009x + 1,1723$	0,9973	0,00054	0,00179
C37	0,015-0,3	$y = 1 \cdot 10^{-7}x^2 - 0,0007x + 0,8911$	0,9936	0,00284	0,00947
C38	0,015-0,3	$y = 1E-07x^2 - 0,0006x + 0,6342$	0,9951	0,00409	0,01364
C39	0,015-0,3	$y = 8 \cdot 10^{-8}x^2 - 0,0004x + 0,4928$	0,9938	0,00458	0,01525
C40	0,03-0,3	$y = 7 \cdot 10^{-8}x^2 - 0,0004x + 0,6528$	0,9927	0,00484	0,01612

Tabla 4. Datos de calibración, LOD y LOQ

Como se puede observar solo se presentan valores a partir de C_{13} esto es debido a dos circunstancias, una de ellas es el efecto matriz, si contemplamos con más exactitud el Gráfico 1 se puede apreciar que para los n-alcenos del C_9 al C_{12} hay un efecto matriz del 100% por lo tanto se puede deducir que en el caso de que hubiera presencia de estos n-alcenos no serían apreciables. En segundo lugar hay que recordar que este tipo de n-alcenos son muy volátiles por lo tanto es muy difícil llegar a detectarlos. Por las razones expuestas las curvas de calibrado solo se pudieron realizar a partir del n-alceno C_{13} .

En cuanto a los datos de la tabla se puede destacar que se obtuvieron ecuaciones de segundo grado lo que es causado al amplio rango de concentraciones al que se enfrenta, también se puede ver que los valores de R^2 son en todo caso superior a 0,9901 lo cual es indicador un buen ajuste respecto a la dispersión de los puntos. En cuanto a los valores de LOD y LOQ son todos aceptables, además presentan numeración muy baja, lo que es beneficiario a la hora de detectar y cuantificar nuestras muestras ya que se debe recordar que en muestras de sedimentos la materia orgánica presenta un 1% por lo que es de esperar obtener concentraciones con valores muy bajos.

4.3. Detección y cuantificación de muestras

Para la realización de este trabajo se ha elegido hacer un estudio de determinados n-alcenos, ya que son un tema en auge y del que no hay gran cantidad de información, pero algo que sí se sabe a ciencia cierta es que son importantes a la hora de determinar químicamente la procedencia de restos arqueológicos y no solo la procedencia si no su composición y para qué eran utilizado. En el caso del trabajo en exposición hablamos de muestras de sedimentos encontrados en la tierra por lo que cómo se explicó en los objetivos, se pretende conocer que actividades se realizaban en los lugares donde se encontró y en el caso de obtener resultados que digan claramente de que son los restos intentar saber para que eran utilizados por los aborígenes.

Este trabajo se ha centrado concretamente en los n-alcenos, y estos varían desde n-alcenos C_{19} hasta n-alcenos C_{39} , esta selección se ha realizado dado que una vez obtenidos los resultados se ha cumplido lo que se esperaba sobre el efecto matriz, además en muchos casos no había presencia de n-alcenos menores en las muestras. Por todo ellos se ha realizado una tabla resumen sobre los resultados obtenidos a partir de los cromatogramas y su posterior análisis:

Resultados y discusión

Muestra	Concentración (µg/g)											
	C-19	C-20	C-21	C-22	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27	C-28	C-29	C-30
CPG 252 (2015)	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ
CPG 258-UE44							0,0057±0,0002		0,006±0,001		0,010±0,002	
CPG 258-UE48					0,10±0,01		0,13±0,01		0,16±0,02		0,26±0,03	
CPG 259-UE28							0,09851±0,00009		0,1433±0,0001		0,1903±0,0008	0,0948±0,0004
CPG 259-UE32					0,0150±0,0004		0,0183±0,0005		0,0204±0,0007		0,031±0,001	
CPG 261-1					0,0140±0,0009		0,0175±0,0008		0,021±0,001		0,031±0,006	
CPG 261-2									0,016±0,003		0,022±0,004	
CPG 262-1					0,080±0,002		0,1346±0,0005		0,192±0,002	0,1225±0,0003	0,213±0,002	0,1299±0,0002
CPG 262-2					0,09±0,01		0,137±0,006		0,204±0,001	0,125±0,006	0,239±0,004	0,140±0,004
CPG262-3			0,030±0,001		0,034±0,002		0,042±0,006		0,055±0,009	0,038±0,003	0,069±0,003	0,039±0,003
CPG 268	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ
CPG 267-1					0,0801±0,0006		0,1356±0,0001		0,1934±0,0006	0,1234±0,0002	0,21±0,01	0,128±0,004
CPG 269-mitad					0,123±0,002		0,170±0,002	0,010±0,002	0,20±0,01		0,236±0,007	0,1676±0,0004
CPG 258-UE45					0,0087±0,0003		0,01342±0,00001		0,0186±0,0001		0,0303±0,0002	0,0104±0,0002
CPG 260-mitad							0,027±0,003		0,029±0,002			
CPG 263	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ
CPG 269-base							0,030±0,001		0,038±0,003			
CPG 269-techo							0,031±0,002		0,0417±0,0001			0,031±0,002

Tabla 5. Resumen de las concentraciones obtenidas por los cromatogramas de los n-alcános desde el C-19 hasta el C-30 de las muestras analizadas

Resultados y discusión

Muestra	Concentración (µg/g)								
	C-31	C-32	C-33	C-34	C-35	C-36	C-37	C-38	C-39
CPG 252 (2015)	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ
CPG 258-UE44	0,008±0,001								
CPG 258-UE48	0,20±0,03		0,11±0,01	0,095±0,003	0,11±0,01				
CPG 259-UE28	0,15560±0,00003		0,1437±0,0002						
CPG 259-UE32	0,022±0,003			0,0174±0,0002	0,0194±0,0002	0,0195±0,0006	0,0200±0,0006	0,020±0,001	0,0230±0,0007
CPG 261-1	0,025±0,005								
CPG 261-2				0,014±0,002					
CPG 262-1	0,173±0,003	0,108±0,001	0,156±0,001						
CPG 262-2	0,208±0,004	0,120±0,006	0,173±0,003	0,10±0,01	0,126±0,005				
CPG262-3	0,05905±0,00005	0,034±0,005	0,057±0,008	0,032±0,003	0,05±0,01				
CPG 268	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ
CPG 267-1	0,174±0,002	0,12±0,01	0,16±0,01						
CPG 269-mitad	0,196±0,008	0,152±0,003	0,22±0,01	0,110±0,001	0,149±0,005				
CPG 258-UE45	0,0253±0,0002								
CPG 260-mitad									
CPG 263	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ	UDQ
CPG 269-base			0,036±0,002						
CPG 269-techo			0,0440±0,0003		0,035±0,002				

Tabla 6. Resumen de las concentraciones obtenidas de los n-alcenos del C-31 al C-39 de las muestras analizadas.

Como se puede observar en la mayoría de los casos se obtienen valores de concentraciones en los n-alcenos de cadena larga, es decir desde el C₂₃ al C₃₅, este comportamiento era de esperar debido a lo comentado anteriormente sobre el efecto matriz. Para poder facilitar la visión de los datos se han realizado las siguientes representaciones gráficas, en las cuales se enfrenta la concentración de los n-alcenos a los n-alcenos posibles de manera que se pueda observar las tendencias:

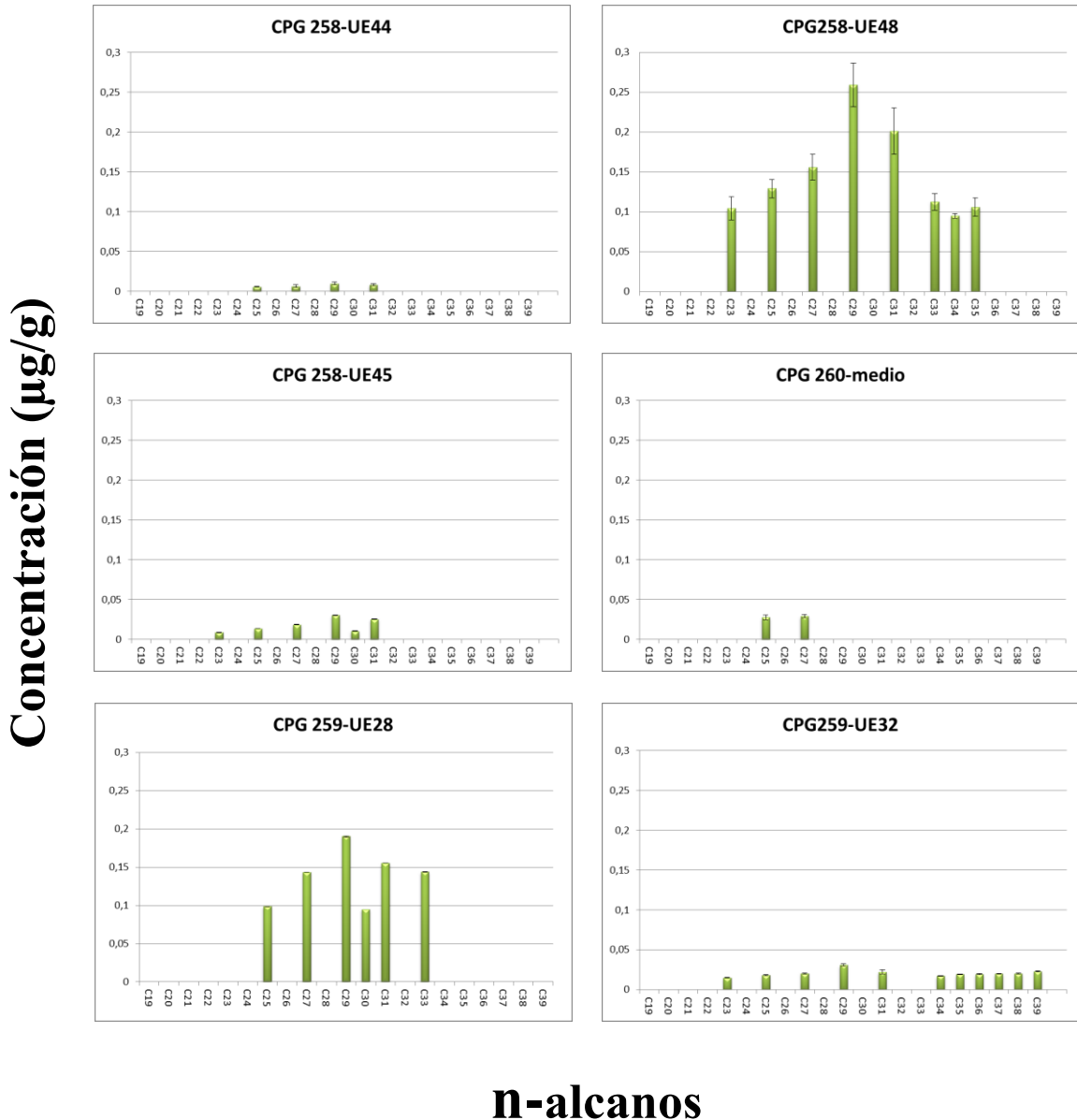
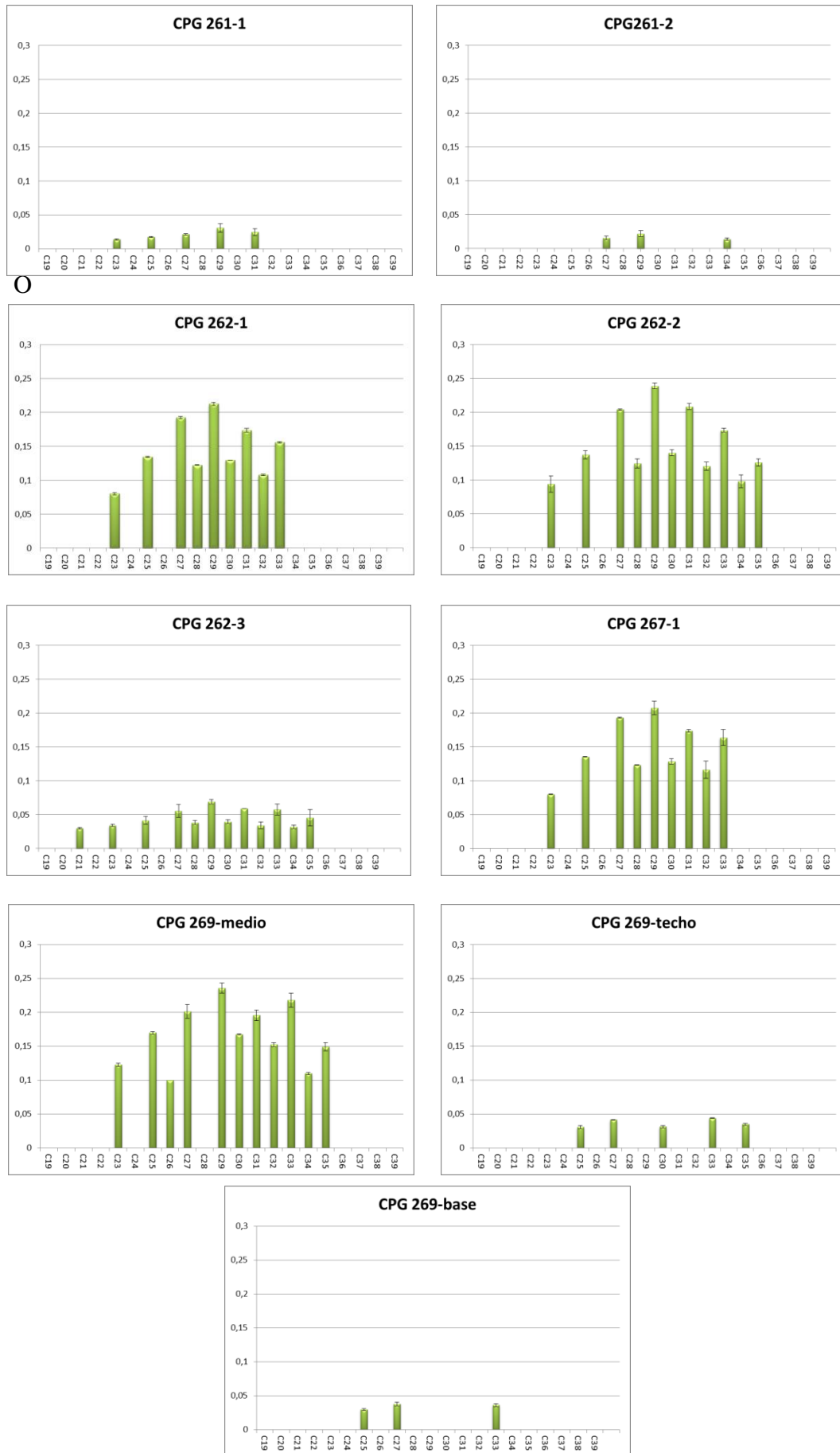


Gráfico 2. Representación de los valores de la concentración de analito para cada muestra

Concentración (µg/g)



n-alcános

Gráfico 3. (Continuación) Representación de los valores de la concentración de analito para cada muestra

Observando las gráficas, lo primero que llama la atención son las diferencias de abundancias de alcanos entre estaciones de muestreo, que incluso varían en una misma estación según las unidades estratigráficas (UE) como es el caso de las estaciones CPG-258 y CPG-259. Una unidad estratigráfica define un cambio en el régimen sedimentológico de la secuencia geológica, lo cual puede deberse a factores físicos como un cambio en el régimen de lluvias, o un factor antrópico como un lugar de depósito de residuos, por ejemplo. También destacan los cambios en las tendencias de ciertos alcanos como ocurre en la muestra CPG-262 y la escasa presencia de n-alcanos de cadena par. En general, los valores máximos de concentración de alcanos en las muestras no superan los 0,3 $\mu\text{g/g}$. En cuanto a los errores cometidos en las cuantificaciones de los alcanos, se ha representado usando los valores de desviación típica de las cuantificaciones obtenidas en las distintas inyecciones de las muestras. En la mayoría de los casos se obtienen errores muy pequeños, exceptuando en algunas muestras como la CPG 261-1, CPG 261-2 y CPG 258-UE44 en la que los errores son mayores. Para mejorar estos niveles de error sería conveniente volver a realizar inyecciones de las muestras y comprobar las medidas de las áreas de los picos de cada analito.

En cuanto a la tendencia de aparición de los n-alcanos, dominan los C_{27} , C_{29} y C_{31} en la mayoría de las muestras. Este tipo de alcanos suelen ser derivados de plantas vasculares terrestres.^[17] Por otro lado, la abundancia de $\text{C}_{29}/\text{C}_{31}$ es característico de plantas herbáceas y cuando abundan $\text{C}_{27}/\text{C}_{29}$ indican la presencia de plantas leñosas como árboles y arbustos.^[31, 32] Exceptuando la muestra CPG 261-2, que no presenta n-alcanos C_{23} y C_{25} el resto de muestra contienen estos n-alcanos en mayor o menor medida. Los n-alcanos de cadena más corta suelen ser indicador de plantas más cercanas a medios acuáticos como macrófitos sumergidos, algas y musgos. Por ejemplo, los alcanos C_{23} y C_{25} han sido descritos como los más abundantes en musgos del género *Sphagnum*.^[31] En muestras como la CPG 269-top, CPG 269-bottom, CPG259-UE28, CPG 258-UE48, CPG 262-2, CPG 269-middle y CPG 262-3, se puede apreciar también la presencia de n-alcanos C_{33} y C_{35} procedentes de plantas vasculares terrestres y que indican además, un buen estado de conservación de la muestra.^[31]

Cabe resaltar que la muestra CPG 259-UE32 se detecta la presencia de alcanos $>\text{C}_{35}$, lo que parece indicar la presencia de vegetación arbórea de especímenes de la familia de las higueras.^[42]

Durante la elaboración de este trabajo se trataron 18 muestras, pero solo se han podido cuantificar 15 de ellas. Las muestras CPG 252-2015, CPG 264-3 y CPG 263, no pudieron ser cuantificadas, esto es debido a que los valores de concentración de los analitos estaban por debajo del límite de cuantificación (LOQ) pero no del límite de detección (LOD), lo que permitió caracterizar los n-alcenos de las muestras mediante los cromatogramas de la Figura 13.

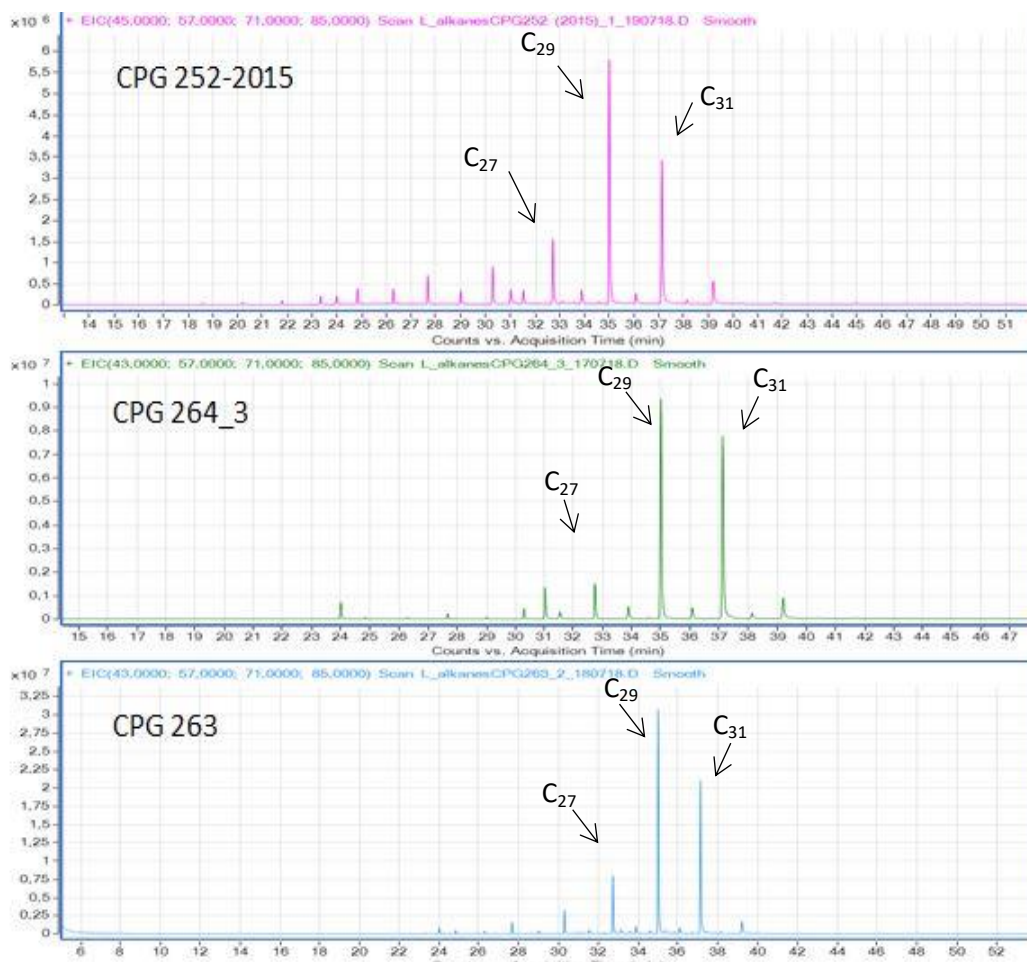


Figura 12. Cromatogramas de muestras inferiores al LOQ

En estas muestras, existe un claro predominio de los n-alcenos C₂₇, C₂₉ y C₃₁ frente al resto de n-alcenos, por lo que se confirma que en estas muestras también hay presencia clara de plantas vasculares terrestres de carácter leñoso y herbáceas.

4.3.1. Cálculo CPI, Paq y ACL

Para evaluar la distribución de los átomos de carbono de n-alcános y su interpretación paleoambiental hemos utilizado los índices descritos anteriormente, el CPI (índice de preferencia del carbono), el ACL (longitud media de cadena de carbono) y el Paq (proporción plantas terrestres y acuosas). Estos índices nos permitirán esclarecer un poco más nuestros resultados.

En cuanto al cálculo de estos parámetros, cabe destacar que aún no existe un consenso entre autores. Algunos hacen los cálculos con las proporciones de los valores de áreas de pico obtenida y otros los realizan con concentraciones. Por esta razón, para aquellas muestras cuyos alcanos no pudieron ser cuantificados, se comprobó si los valores de estos parámetros calculados como proporciones de área seguían la tendencia de los valores obtenidos con las concentraciones. De este modo, los valores obtenidos para los distintos indicadores están reflejados en la Tabla 8:

Muestra	CPI	ACL	Paq
CPG 252 (2015)	7,04	28,46	0,13
CPG 258-UE44	12,59	29,36	0,08
CPG 258-UE48	11,24	29,44	0,34
CPG 259-UE28	7,72	29,36	0,22
CPG 259-UE32	2,96	32,33	0,39
CPG 261-1	12,72	29,08	0,10
CPG 261-2	2,71	29,74	0
CPG 262-1	2,63	28,92	0,36
CPG 262-2	2,45	29,73	0,34
CPG262-3	2,73	29,30	0,37
CPG 268	10,02	29,59	0,03
CPG 267-1	2,59	28,96	0,36
CPG 269-middle	2,44	29,67	0,40
CPG 258-UE45	9,30	28,23	0,28
CPG 260-middle	9,14	26,27	0,17
CPG 263	15,62	29,13	0,08
CPG 269-bottom	9,04	29,75	0,10
CPG 269-top	4,83	30,16	

Tabla 7. Valores de ACL, CPI y Paq en las muestras

Los valores de CPI han oscilado entre 12,59 y 2,44 obteniéndose una media de 7,10 con una desviación típica de 4,32, para el ACL los datos obtenidos varían entre 32,33 y 26,27 dando una media de 29,30 con una desviación típica de 1,14.

Cuando los valores de CPI son superiores a 5 se considera que pertenecen a plantas vasculares terrestres, y eso es lo que nos indica el CPI promedio. Por otro lado, también se ha explicado que ocasiones estos valores disciernen y se han observado CPI de plantas vasculares terrestres con valores de CPI por debajo de 5. Los valores muy altos de CPI pueden ser debidos a que el sedimento no ha estado sometido a procesos de degradación con el paso del tiempo y posiblemente han estado en condiciones frías y secas en cambio aquellos con valores próximos a 1 han sufrido mayor degradación y por lo tanto es posible que hayan estado expuesto a calor y humedad.^[16]

En cuanto a los parámetros obtenidos de ACL, estos no presentan tanta oscilación entre ellos. Los valores entre 29,3 y 30,4 son señal de presencia de plantas herbáceas, y, también pueden observarse valores entre los 26,27 y 29,8 típicos de plantas leñosas¹⁶. Estos valores altos de ACL, por otro lado indican que las condiciones climáticas existentes durante la formación de ese suelo pudieron ser cálidas y húmedas.

En cuanto al último indicador, Ficken y *col.* aseguran que los valores $Paq < 0,1$ corresponden a una contribución dominante de plantas terrestres, mientras que los valores entre 0,1–0,4 reflejan una aportación significativa de macrófitos emergentes, o una mezcla de aportes de plantas terrestres, macrófitos emergentes y sumergidos/flotantes.^[16] Los valores comprendidos entre 0,4–1 son típicos de macrófitos sumergidos/flotantes. Según esto y como se puede observar; en este caso parece indicar la existencia en la mayoría de las estaciones una mezcla de plantas terrestres, macrófitos emergentes y sumergidos/flotantes. En el caso de las muestras CPG 258-UE44, CPG 268, CPG 263 que presentan valores inferiores a 0,1 se puede decir que se tienen abundan la presencia de plantas terrestres. Existe un último caso, la muestra CPG 269-top en la cual se obtiene un valor de 1, que puede deberse a un artefacto matemático, ya que no concuerda con los resultados de CPI y ACL.

4.3.2. Análisis de los ratios C_{27}/C_{29} y C_{29}/C_{31}

Como se comentó anteriormente, los alcanos predominantes son C_{27} , C_{29} y C_{31} , pero esto pone en duda la predominancia de plantas de leñosas o herbáceas. Por este motivo, se ha decidido realizar un diagrama ternario (Figura 14) que evalúe la tendencia de los alcanos predominantes. Esto permitirá establecer una tendencia predominante de manera más o menos clara.

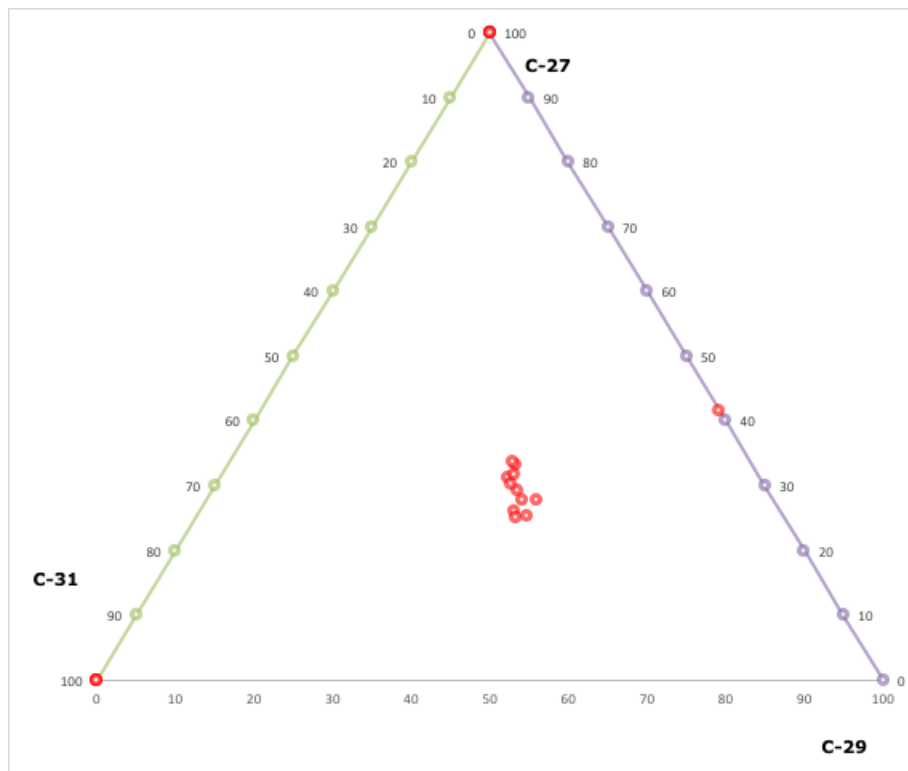


Figura 13. Diagrama ternario con las relaciones de ratio para los n-alcanos dominantes

Lo que nos muestra este diagrama es que, exceptuando algunas muestras, en su mayoría siguen una tendencia hacia C_{29}/C_{31} , lo que indica que el tipo de vegetación predominante en las muestras de las viviendas de Cueva Pintada son de tipo herbáceas.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que:

- La matriz de la muestra provoca una eliminación de señal en los n-alcenos del C₉ al C₁₂, y una disminución de la misma en el resto de los n-alcenos exceptuando el C₂₇, C₂₉ y C₃₁ los cuales presentan un aumento de la misma.
- Las muestras obtenidas en el yacimiento de Cueva Pintada de Gáldar contienen una alta presencia de n-alcenos C₂₉ y C₃₁ en la mayoría de los casos.
- En los sedimentos analizados habían restos de plantas vasculares terrestres, destacando las plantas de tipo leñoso.
- La presencia de n-alcenos de cadena larga de C₃₆ a C₃₈ en la muestra CPG 259-UE32 son datos atípicos en el estudio geoquímico, pero parecen ser indicadores de especies vegetales de la familia de las higueras. La existencia de estos n-alcenos es debido a la buena preservación de la muestra.
- Con lo obtenido se corrobora la información micromorfológica, ya que se obtienen datos que aseguran la presencia de plantas herbáceas y leñosas mezcladas.
- Los datos de CPI, ACL y Paq revelan, al igual que el resto de datos, la existencia de plantas herbáceas y leñosas en los sedimentos.
- El diagrama ternario nos muestra un alto contenido de plantas herbáceas y leñosas debido a la presencia de los n-alcenos C₂₇, C₂₉ y C₃₁.

6. Referencias

1. M. Pollard, C Batt, B.Stern and Suzanne M.M.Young . Analytical Chemistry in Archaeology. Manuals in Archaeology. General Editor Graeme Barker, University of Cambridge. Cambridge 2007.
2. F. Szabadváry, P. Press .History of Analytical Chemistry. Technical University of Budapest.1966
3. C. Renfrew y P. Bahn. Arqueología: teorías, métodos y prácticas. Akal.2011. 2ªED.
4. García-García,I, Cañete-Rodríguez. Ana M, Santos-Dueñas Inés .M., Jiménez-Hornero J.E, Ehrenreich.A, Liebl.W, García-Martínez.T, Mauricio.J.C. *Pagepress*.**2017**. 6:6458
5. Engel, M. H., and S. A. Macko . Organic Geochemistry.**1993**.
6. Malainey, M. E. *Science: Analytical Techniques*. **2011**. A Costumer's Guide to Archaeological London: Springer; Reber, E. & Evershed, R. P. *Journal of Archaeological Science*. **2004**. (4) 31, 399- 410.
7. Eglinton G, Gonzalez AG.,Hamilton,R.J, Raphael R.A. *Phytochemistry*. **1962**. 1:89-102
8. Olmec Luis F. Hernández.L, Cyphers.A, N Gaikwad.N. *El Servier*. **2017**.
9. Yan Bai, Xiaomin Fang, Junsheng Nie, Yongli Wang, Fuli Wu. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* . **2009**. 271: 161–169
10. Cañabate Guerrero.M.L, Sánchez Vizcaíno.A. *Complutum*. **1995**. 6: 281-291
11. Cranwell, P.A. *Org. Geochem* .**1981**. 3: 79-89.
12. Brassell, S.C., Eglinton, G. *Advances in Organic Geochemistry*. **1983**. 684-697.
13. Mackenzie A.S., Brassell S.C., Egeinton G. y Maxwell J.R. *Science* **1982**. 217: 491-505.;
14. Cranwell, P.A., Eglinton, G., Robinson, N. *Org. Geochem*. **1987**. 11: 513–527.
15. Ficken, K.J., Li, B., Swain, D.L., Eglinton, G. *Org. Geochem*. **2000**. 31(7-8): 745-749.
16. Eglinton, G., Hamilton, R.J. *Science* .**1967**. 156 (3780), 1322-1335.
Riele, G., Collier, R.J., Jones, D.M., Eglinton, G. *Org. Geochem*. **1991**. 17, 901–912.
17. Eglinton, G., Hamilton, R.J. *Science* .**1967**. 156 (3780), 1322-1335.

18. Mügler, I., Sachse, D., Werner, M., Xu, B., Wub, G., Yao, T., Gleixner, G. *Org. Geochem.* **2008.** 39, 711–729.
19. Sachse, D., Radke, J., Gleixner, G. *Org. Geochem.* **2006.** 37, 469–483.
20. Xie, S., Nott, C.J., Avsejs, L.A., Maddy, D., Chambers, F.M., Evershed, R.P. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2004.** 68, 2849–2862.
21. Kolattukudy, P. *Academic Press*. **1980.** 571–645.
22. <http://www.cuevapintada.com/>
23. Mallol, C., pendiente de publicación
24. Eckmeier E., Guido L.B. Wiesenberg. *Journal of Archaeological Science.* **2009.** 36,1590-1596
25. Souza Santos Cheibuba A.M., Silva Bahiense de Lyraa E., Duarte Pereira Nettoa A. *Science+Bussines*. **2015.** 8:392–400
26. <http://goldbook.iupac.org/html/M/M03759.html>
27. Herrera-Herrera A.V., Mallol C. *Organic Geochemistry*. **2018.** Manuscrito aceptado.
28. Biomarcadores como indicadores paleolimnológicos.
29. Diego A. Ahumada, Jairo A. Guerrero. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad Católica del Valparaíso*. **2010.** 17:51-58.
30. Rosemary T. Bush, Francesca A. McInerney. *Sciverse Science Direct*. **2013.** 117:161-179
31. Ferri, Carlos M. Pagella, José H. Brizuela, Miguel A. y Stritzler, Néstor P. *Sitio Argentino de Producción Animal*. **2007.**
32. Hedges, J.I., Prahl, F.G.. *Organic Geochemistry* .**1993.** 237–253.
33. Zhang, Z., Zhao, M., Yang, X., Wang, S., Jiang, X., Oldfield, F., Eglinton, G.. *Org. Geochem.* **2004.** 35, 595–613.
34. Tissot, B.P., Welte, D.H.. Springer-Verlag, New York.. **1984.**
35. Haddad, R.I., Martens, C.S., Farrington, J.W.. *Org. Geochem.* **1992.** 19, 205–216.
36. Meyers, P.A., Ishiwatari, R.. *Org. Geochem.* **1993.** 20(7), 867-900.
37. Brincat, D., Yamada, K., Ishiwatari, R., Uemura, H., Naraoka, H.. *Org. Geochem.* **2000.** 31, 287–294.
38. Sachse, D., Radke, J., Gleixner, G.. *Geochim. Cosmochim.* **2004.** 68, 4877–4889.

39. Pancost, R.D., Baas, M., van Geel, B., Sinninghe Damsté, J.S.. *Org. Geochem.* **2002.** *33*, 675–690.
40. Sachse, D., Radke, J., Gleixner, G.. *Org. Geochem.* **2006.** *37*, 469–483.
41. Rahmad B., Anggayana K., Notosiswoyo S, Widodo S, Widayat A.H.. *Sciverse Science.* **2013.** *6*:38-41