

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

4.1. TRABAJO DE LABORATORIO

4.1.1. Identificación de los restos

Salvo algunos fragmentos de diáfisis muy pequeños, casi todos los restos han sido susceptibles de atribución anatómica. En la identificación a nivel taxonómico se ha utilizado como primer nivel básico de referencia el atlas de Pales y Lambert (1971) y la obra ya clásica de Lavocat (1966) sobre las faunas prehistóricas. En el caso de piezas de más difícil identificación se han usado, una reducida colección comparativa propiedad de Pedro Castaños, la Osteoteca de la Sociedad de Ciencias Aranzadi y en las aves la Colección de Comparación del Laboratorio de Zooarqueología de la Universidad Autónoma de Madrid.

4.1.2. Cuantificación de la muestra

Para estimar la abundancia relativa de cada especie en los diferentes niveles de Kiputz IX así como en las comparaciones con otros yacimientos, se utilizan dos parámetros: el número de restos y el número mínimo de individuos.

Cada hueso, diente, cuerna o clavija córnea recuperados en la excavación, esté completo o fragmentado, será considerado como un resto independiente. El número de restos incluye tanto los identificados como los no identificados o esquirlas. El porcentaje del número de restos se utiliza tanto para cuantificar las distintas regiones anatómicas dentro de una especie como la frecuencia relativa de cada especie dentro del yacimiento.

El otro parámetro utilizado es la estimación del número mínimo de individuos distintos de una especie que han aportado algún resto a la muestra. Para estimar el número mínimo de individuos se contabilizan los elementos anatómicos identificados más abundantes así como la bilateralidad y el sexo de los mismos. En esta muestra las piezas utilizadas para el cálculo del NMI han sido el astrágalo, el calcáneo y el centro-tarsal.

4.1.3. Determinación del sexo

El metacarpo parece ser el hueso que mejor representa en algunos ungulados el dimorfismo sexual como consecuencia del peso extra que los machos soportan en los cuartos delan-

teros, por el desarrollo de las astas en los cérvidos y de los procesos cornuales en los bóvidos. Por ello se utilizan distintos métodos basados en este hueso en las tres especies mejor representadas. Uno de ellos es el Índice de Robustez que se aplica a los metacarpos de bisontes de Kiputz IX. Se determina mediante el porcentaje de la anchura mínima en la diáfisis, respecto de la longitud del hueso ($AD.100 / LM$). Los huesos con valor de índice inferior a 20,7 se atribuyen a hembras y los que superan el valor de 22 a machos, siguiendo el criterio utilizado en la rica muestra del yacimiento de Jaurens (Nespouls, Francia) (Guérin y Valli 2000). Este índice ha sido utilizado en el estudio de distintos yacimientos en Francia (Mourer-Chauviré 1972; Brugal 1984-1985; Vercoutère y Guérin 2010).

En el estudio del dimorfismo sexual del ciervo y del reno se utilizan diagramas de dispersión entre pares de medidas que se especifican en el estudio sistemático. Otro método para reflejar el grado de dimorfismo sexual son los diagramas de Simpson (Simpson 1941) aplicados a las distintas medidas del metacarpo.

4.1.4. Estimación de la edad

El estadio de sustitución dentaria y el de fusión epifisiaria se han utilizado para la estimación de las edades de los distintos individuos presentes en Kiputz IX. En el caso del bisonte, se ha analizado el estado de erupción dentaria en las series que conservaban aún molares de leche. Se han aplicado criterios a partir de datos obtenidos en el bisonte europeo (Wegrzyn y Serwatka 1984). Para el ciervo se han aplicado los modelos de Mariezkurrena (1983), versión mejorada de la que utiliza Payne (1973). En el caso del reno se ha seguido la metodología de Bouchud (1996), utilizada por autores como Weinstock (2000) y Alvarez-Laó (2007).

4.1.5. Restauración de algunos restos

Todos los restos protegidos con fundas de escayola durante la excavación fueron enviados al Servicio de Restauración Arqueológica de la Diputación Foral de Gipuzkoa para una restauración de carácter profesional que ha permitido obtener de dichas piezas una información morfométrica de gran interés y que por su bajo potencial de preservación en los yacimientos paleontológicos, rara vez pueden extraerse completas.

4.2. OSTEOMETRÍA Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

4.2.1. Medidas, estadística univariante y abreviaturas

Las medidas se han tomado con un calibre de puntas finas de la marca Mitutoyo. Todas ellas se han obtenido siguiendo la metodología ya clásica de A.v.d. Driesche (1976), utilizada en la mayor parte de yacimientos europeos. Se expresan en mm con un error estimado de 0,5 mm en todas las que superan los 20 mm y de 0,05 mm en las demás.

El análisis estadístico se ha realizado utilizando el programa PAST (Paleontological Statistics) de uso común en estudios paleontológicos (Hammer 2012).

Se ha utilizado el test *T* de Student para muestras independientes con el fin de evaluar si existen diferencias significativas entre los valores medios de huesos del nivel D y F. La confirma-

ción de la normalidad de las distribuciones se ha realizado mediante los tests de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk 1965) o chi cuadrado según el tamaño de la muestra. Los datos isotópicos obtenidos no siguen una distribución normal y por tanto para evaluar las diferencias entre los grupos de los estadales e interestadales se ha realizado el test no paramétrico de "Kruskal-Wallis" (Kruskal y Wallis 1952). La significación estadística ha sido aceptada como $p < 0.05$.

Se ofrecen las abreviaturas de medidas, estadísticos univariantes y partes anatómicas del esqueleto utilizadas a lo largo del trabajo (Tabla 4.1).

4.2.2. Diagramas de Simpson

Son diagramas de relación o "ratio diagrams" (Simpson 1941) que permiten realizar comparaciones sencillas y rápidas tanto del tamaño como de la forma de un hueso o de un conjunto de huesos. Se comienza por establecer un modelo de referencia (estándar) eligiendo un hueso o conjunto de huesos cuyas dimensiones o

MEDIDAS		ANATOMÍA Y ESTADÍSTICA	
A	Anchura	CR	Cráneo
AA	Anchura acetabulo	MA	Mandíbula
AD	Anchura mínima diáfisis	VE	Vértebra
Ad	Anchura distal	CO	Costilla
AM	Anchura máxima	ES	Escápula
Ap	Anchura proximal	HU	Húmero
APC	Anchura proceso coronoide	RA	Radio
AS	Anchura cavidad glenoidea	UL	Ulna
AScd	Anchura superficie caudal	MC	Metacarpo
AScr	Anchura superficie craneal	PEL	Pelvis
ASp	Anchura superficie proximal	FE	Fémur
AT	Anchura tróclea	RO	Rótula
EC	Espesor cabeza fémur	TI	Tibia
Ed	Espesor distal	MT	Metatarso
EI	Espesor lateral	F1	Falange primera
EPA	Espesor proceso anóneo	F2	Falange segunda
EmO	Espesor mínimo olécranon	F3	Falange tercera
LA	Longitud acetábulo	i	Izquierdo
Ldo	Longitud dorsal	d	Derecho
LM	Longitud máxima	n	Número de datos
LmC	Longitud mínima cuello	Min.	Mínimo
LMI	Longitud máxima lateral	Max.	Máximo
LMm	Longitud máxima mesial	X	Media aritmética
LMP	Longitud máxima proceso articular	s	Desviación típica
LMpe	Longitud máxima periférica	NR	Número de restos
LO	Longitud olécranon	NMI	Número mínimo de individuos
LS	Longitud cavidad glenoidea	NI	Número de individuos
LSD	Longitud superficie plantar	a	Anterior
LMI	Longitud máxima lateral	p	Posterior

Tabla 4.1. Abreviaturas de medidas, estadísticos univariantes y partes anatómicas del esqueleto utilizadas a lo largo del trabajo.

frecuencias se transforman en logaritmos decimales. Lo mismo se hace con las medidas o frecuencias de las muestras que se quieren comparar. Finalmente las diferencias entre los logaritmos de referencia y los de las muestras se sitúan por encima o por debajo de la línea "0" según sean positivas o negativas. Al ser diagramas logarítmicos se conservan las proporciones cualquiera que sea la naturaleza de los datos absolutos. De esta forma los diagramas de dos muestras de distinto tamaño pero de la misma proporción, serán paralelos en la gráfica.

4.2.3. Índice de comparación de masa (VSI)

El índice de comparación de masa o "Variability size index" sirve para comparar el tamaño global del esqueleto y tiene su origen en trabajos de Arqueozología (Uerpmann 1982, 1990; Meadow 1986, 1990). Ha sido utilizado en estudios regionales de reno (Weinstock 2001) y de ciervo (Liouville 2007). Este parámetro permite comparar varias muestras, aunque sean pequeñas y fragmentarias, poniendo en evidencia variaciones de tamaño en la osteometría de las especies a lo largo del tiempo o del espacio.

Se elige una población estándar con su media aritmética (X) y su desviación típica (s) para cada medida de los distintos huesos. Para cualquier medida aislada o media de una muestra que se quiera comparar (m) con la de referencia, se calcula un índice de tamaño mediante la fórmula: $VSI = 50(X - m / 2s)$ donde x =medida o media de la muestra a comparar, X =media aritmética de la población estándar y s =desviación típica de la población estándar. Este índice expresa la distancia positiva o negativa en unidades de desviación típica de la medida comparada respecto de la media estándar. Permite incluir en la comparación cualquier medida aislada de un hueso aunque falten otras por estar el hueso roto. Este parámetro presenta importantes ventajas sobre métodos utilizados anteriormente, ya que recoge todas las medidas de los distintos huesos en una sola distribución.

Tras su aplicación se obtiene una distribución constituida por todos los índices de tamaño calculados (VSI). Los parámetros univariantes de la misma, permiten evaluar de forma global el grado de coincidencia o de divergencia del tamaño de una especie respecto del modelo de referencia.

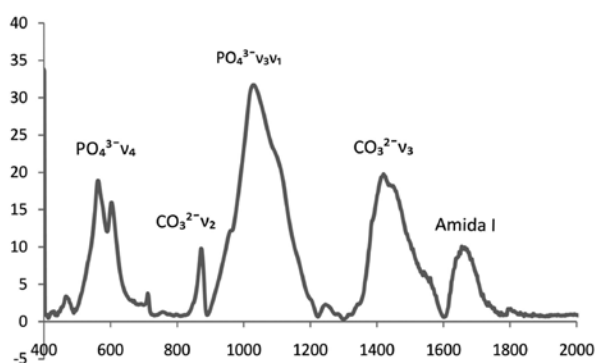


Figura 4.1. Espectro de infrarrojos de un hueso arqueológico obtenido del yacimiento de Kiputz IX (Mutriku, Gipuzkoa) donde se muestran las diferentes bandas de absorción, indicando a qué tipo de enlace y molécula corresponden.

4.3. ANÁLISIS ISOTÓPICO DE LAS MUESTRAS

4.3.1. Extracción de colágeno

La extracción del colágeno se ha realizado según el método propuesto por Bocherens et al. (1991). 1º Se han pesado 300 mg de muestra molida. 2º Se desmineralizan en una solución 0,5M de HCl durante 20 minutos a temperatura ambiente. 3º El residuo insoluble se soniquea en una disolución de Na OH 0,125 N durante una noche, también a temperatura ambiente. 4º Se calientan en tubos de ensayo cerrados los residuos lavados, a una temperatura de 90º C durante 17 h, mezclados en una solución de HCl 10⁻³M (pH3) para gelatinizar el colágeno. 5º El colágeno obtenido en forma de gelatina, se pasa por un filtro de 5 (μm) y se congela. 6º Se liofilizan las muestras y se vuelven a pesar para determinar la cantidad de colágeno. La muestra de colágeno (2.5 a 3.5 mg) se introduce en una cápsula de estaño para la combustión del flujo continuo y el análisis isotópico.

Todas las muestras han sido analizadas en un espectrómetro de masas con analizador elemental con flujo continuo (EA-IRMS, Iso-Analytical, Cheshire, UK).

El contenido en colágeno de los huesos varía entre 13.5% y 0.4% en peso, con un valor promedio de 4.53%. En este estudio solo se han considerado las muestras que presentan relaciones C/N entre 2.7 y 3.3 porcentajes de carbono superiores al 3% y 8% respectivamente (DeNiro 1985; Ambrose 1990).

4.3.2. Preparación de fosfatos de plata (Ag₃PO₄)

Los fosfatos de plata se han realizado siguiendo una modificación de la metodología propuesta por Dettman, 2001. El primer paso ha sido pesar de 2,5 a 10 mg de muestra (huesos y dientes). Seguidamente se ha introducido la muestra en 2 ml de 2M HF durante 36 horas. Posteriormente se centrifugan las muestras en tubos de polipropileno de 12 ml a 3000 rpm durante 10 minutos. El residuo se lava primero con 8 ml de agua bidestilada y luego con 10 ml. Finalmente, se neutraliza la solución con 1,6 ml de NH₄OH al 6%.

4.3.3. Cálculo de las proporciones isotópicas

Los resultados isotópicos de carbono y nitrógeno en colágeno han sido realizados por el laboratorio Iso-Analytical de Reino Unido. Los resultados isotópicos de carbono y oxígeno obtenidos de la fracción carbonato han sido proporcionados por el Laboratori d'Anàlisis d'Isòtops Estables (IRMS) de la Universitat Autònoma de Barcelona. Por último los resultados de oxígeno de la fracción fosfato han sido emitidos por el laboratorio de isótopos estables de la Universidad de Salamanca.

Los valores de la proporción isotópica del oxígeno ($\delta^{18}O$) en fosfato se calculan con referencia al estándar internacional SMOW (Standard Mean Ocean Water) (Craig 1966) y en carbonato con respecto al estándar internacional PDB (Pee Dee Belemnite Limestone) que es un carbonato de origen marino de la formación cretácica Peedee en Carolina del Sur (Craig 1957).

Nº	Parámetro	Cálculo	Propiedad	Referencia
1	IC1	I_{1030}/I_{1020}	Cristalinidad	Boskey et al. (2003)
2	IC2	$(I_{567} + I_{605})/I_{590}$	Cristalinidad	Weiner y Bar-Yosef (1990)
3	Mineralización	$A(900-1200)/A(1587-1720)$	Mineralización	Pienkowski et al. (1997)
4	CO ₃ /Matrix	$A(860-890)/A(1587-1720)$	Mineralización	Smith et al. (2007)
5	Mineral/Matrix	$A(900-1200)/I_{1660}$	Mineralización	Adaptado Pienkowski et al. (1997)
6	Madurez colágeno	I_{1660}/I_{1690}	Fracción orgánica	Paschalis et al. (2001)
7	TipoB/TipoA	I_{878}/I_{872}	Sustituciones del ion carbonato	Rey et al. (1989)
8	Carbonato tipo A	$I_{872}/A(860-890)$	Sustituciones del ion carbonato	Rey et al. (1989)
9	Carbonato tipo B	$I_{878}/A(860-890)$	Sustituciones del ion carbonato	Rey et al. (1989)
10	Carbonato/Fosfato	$A(860-890)/A(900-1200)$	Ratio carbonato/fosfato	Smith et al. (2007)
11	C/P	I_{1415}/I_{1035}	Ratio carbonato/fosfato	Sponheimer et al. (1999)
12	Min CO ₃	$I_{1405}/A(900-1200)$	Ratio carbonato/fosfato	Adaptado Smith et al. (2007)

Tabla 4.2. Parámetros. I: valor del pico; A: área bajo la curva del intervalo; IC: índice de cristalinidad.

4.4. ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS

La Espectroscopía de Infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) se basa en la interacción de la luz infrarroja con una sustancia química (en nuestro caso el hueso) que a través de procesos de absorción proporciona un patrón de bandas denominado espectro. La posición e intensidad de estas bandas permiten un análisis cualitativo y cuantitativo de los componentes de la muestra.

Los espectros de infrarrojo han sido obtenidos en un espectrofotómetro FT-IR Mattson Satellite, registrándose el intervalo de 400 a 4000 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹. Se han utilizado muestras en polvo en una matriz de bromuro potásico (Aldrich 22,186-4, FT-IR grade), previamente secado a 100°C, con una concentración de 1% en peso.

El espectro infrarrojo del hueso presenta bandas de absorción correspondientes a distintos tipos de enlaces. Las bandas y picos de mayor interés corresponden al intervalo de frecuencias 400-2000 cm⁻¹. Dentro de este intervalo aparecen dos bandas distintas de absorción del grupo fosfato (PO₄³⁻ n₄ y PO₄³⁻ n₁ n₃), otras dos del grupo carbonato (CO₃²⁻ n₂ y CO₃²⁻ n₃) y una banda del grupo Amida I (Fig. 4.1).

A partir de los datos de infrarrojos se han definido diferentes parámetros que permiten un análisis de la composición química y cristalográfica del hueso (Tabla 4.2). En este trabajo se han utilizado una docena de parámetros a los que se añade el contenido de colágeno de cada muestra determinado gravimétricamente.

Los índices cristalográficos IC1 e IC2 permiten evaluar el tamaño y regularidad del cristalito de hidroxiapatito. El primer índice es una relación entre los picos más altos de la banda de PO₄³⁻ n₄ que representan el apatito más cristalino y menos cristalino (Boskey et al. 2003). El parámetro IC2 cuantifica el grado de resolución de otros dos picos de la banda de PO₄³⁻ n₁ n₃ en las longitudes de 567

y 605 cm⁻¹ y se determina según la relación IC = (I₅₆₇ + I₆₀₅)/I₅₉₀ asumiendo una línea de base recta entre 700 y 500 cm⁻¹. Los huesos con cristales de apatito más grandes y más ordenados presentan un mayor grado de separación de estos picos y por tanto un valor de IC más elevado (Wright y Schwarcz 1996).

El grado de mineralización del hueso se ha estimado mediante tres parámetros diferentes. Los parámetros mineral 1 y mineral 2 estiman el contenido de fosfato en hueso frente a la fracción orgánica representada por la Amida I y el tercer parámetro CO₃/matrix sirve para estimar la relación entre el contenido en carbonato y la matriz orgánica.

Se puede realizar una estimación del contenido de colágeno a partir de la medida del área o de la intensidad del pico correspondiente al grupo amida I a 1640 cm⁻¹. De igual modo se puede estimar el grado de madurez del colágeno a partir de la relación I₁₆₆₀/I₁₆₉₀ correspondientes al grupo Amida I.

En los apatitos biogénicos modernos, el carbonato (CO₃²⁻) puede sustituir tanto al grupo hidroxilo (OH) en posición A como al grupo fosfato PO₄³⁻ en posición B. La sustitución del carbonato por el fosfato distorsiona la red cristalina y hace que decrezca la estabilidad del apatito biogénico (Nelson 1981; Nelson et al. 1983). El grado en el que el carbonato entra en la estructura cristalina del apatito se determina midiendo la intensidad de absorción I₈₇₂ cm⁻¹ e I₈₈₀ cm⁻¹ respectivamente respecto al área 860 a 890 cm⁻¹ correspondiente a la banda n₂ del carbonato.

Los tres últimos índices hacen referencia a la relación entre los componentes minerales del hueso, estudiándose la relación entre el contenido de carbonato y de fosfato. A través de estos parámetros se analizan cinco propiedades del hueso que se aplicarán a la comparación entre restos de individuos de distinta edad y de distintas especies.