

ANÁLISIS PIXE EN MUESTRAS ÓSEAS SUBFÓSILES: ENSAYO DE UN PROTOCOLO DE PREPARACIÓN

PIXE ANALYSIS IN SUBFOSSIL BONE SAMPLES: TESTING A PREPARATION PROTOCOL

García-Viñas, E.

Departamento de Sistemas Físicos, Químicos y Naturales.
Universidad Pablo de Olavide.

Gómez Tubío, B.

Departamento de Física aplicada III.
Universidad de Sevilla
Centro Nacional de Aceleradores.
Universidad de Sevilla, CSIC y Junta de Andalucía

Ortega-Feliú, I.

Centro Nacional de Aceleradores. Universidad de Sevilla,
CSIC y Junta de Andalucía

Bernáldez-Sánchez, E.

Departamento de Sistemas Físicos, Químicos y Naturales.
Universidad Pablo de Olavide.
Laboratorio de Paleontología y Paleobiología. Instituto
Andaluz del Patrimonio Histórico

RESUMEN

Los huesos subfósiles son una fuente de información que va más allá del estudio taxonómico y tafonómico a nivel macroscópico. En este sentido, las técnicas de ADN antiguo y las físico-químicas están aportando nuevas perspectivas a los análisis paleobiológicos llegando a describir patrones de domesticación, migración, contaminación ambiental, etc. No obstante, el proceso de diagénesis, por el que pasan todos los restos subfósiles, conlleva una problemática asociada que afecta a este tipo de estudios genéticos y físico-químicos. Además de las pérdidas de material que se producen por erosión, la composición química se puede ver afectada por procesos de disolución, precipitación, absorción, sustitución mineral y recristalización. Todos estos problemas de contaminación están siendo tratados por diferentes especialistas que preparan las muestras en función de los objetivos a alcanzar y de las técnicas a utilizar. Con este trabajo de investigación se pretende desarrollar un protocolo de preparación de muestras efectivo para la detección de contaminaciones ambientales prehistóricas e históricas a partir del estudio de elementos traza con una técnica no destructiva, PIXE.

Palabras clave: PIXE, elementos traza, diagénesis, bioacumulación, subfósil.

ABSTRACT

Nowadays, we are obtaining new information about our history using genetic and physico-chemical analysis on subfossil bones. Nevertheless, during the fossilization there are several processes that could change the results of these kinds of analysis. The chemical composition could change due to processes of dissolution, precipitation, absorption, mineral substitution or recrystallization. All of these problems are being studied by different research teams with different objectives, but in this paper, we have essayed some protocols to clean samples in the study of ancient bioaccumulations registered in subfossil bones using PIXE technique.

Key words: PIXE, trace elements, diagenesis, bioaccumulation, subfossil.

1. INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conjuntivo que, entre otras funciones, sirve como reservorio de elementos esenciales para el organismo (Glimcher, 1998; Barone, 1999). No obstante, dicha función, también favorece la bioacumulación de algunos metales derivados de la polución (Arnay-De-La-Rosa et al., 1998; Baranowska et al., 1995; González-Reimers et al., 2003; Grattan et al., 2002; Martínez-García et al., 2005), motivo por el cual los huesos subfósiles pueden utilizarse como un método indirecto de medida de la contaminación ambiental en la antigüedad, al menos desde los orígenes de la metalurgia durante la prehistoria reciente (Nocete, 2006). Por ejemplo, en el sur de la Península Ibérica se han detectado niveles elevados de Cu, Zn, Pb y As en muestras de suelo y bivalvos datados en la Edad del Cobre (Aléx et al., 2004; Nocete et al., 2005), pero no se han realizado análisis en restos óseos. Estos son por lo general escasos y suelen llevarse a cabo en huesos de humanos que durante su vida pudieron desarrollar actividades altamente contaminantes (Martínez-García et al., 2005), siendo aún menos frecuentes los trabajos sobre bioacumulación de metales en huesos de animales (Bernáldez et al., 2013). En los huesos subfósiles existe además la probabilidad de encontrar trazas de elementos incorporados durante el proceso de fosilización¹, ya que los huesos se mineralizan normalmente con carbonatos, sílice o pirita. Durante este proceso se pierde la materia orgánica y se producen cambios en la cristalinidad y porosidad, pudiéndose detectar variaciones en propiedades químicas relacionadas con la disolución, precipitación, absorción, sustitución de minerales y recristalización (Carvalho et al., 2004). En relación con todos estos procesos, Shafer et al. (2008) establecen dos tipos principales de contaminación de los huesos durante la fosilización: oclusión

e intrusión de partículas del suelo en los poros, y absorción y reemplazamiento de algunos elementos en la estructura ósea. En este sentido es destacable el estudio bioestratinómico realizado por Trueman et al. (2004) en el Parque Nacional de Ambosely (Kenia), donde se describen los diferentes minerales (barita, calcita, trona, crandalita y probablemente sepiolita) que se incorporan al hueso antes del enterramiento. Además, esta modificación en la composición del hueso subfósil se puede ver incrementada durante la fase diagenética, cuando la bioerosión y las reacciones químicas son más importantes (Hedges, 2002). En línea con esta idea, análisis realizados sobre huesos subfósiles determinan la presencia de elementos exógenos incorporados a los mismos durante la diagénesis (Carvalho et al., 2004; Farnum et al., 1995). Por lo tanto, en los estudios de elementos traza de huesos subfósiles es importante destacar la incorporación de algunos de estos elementos durante el proceso de fosilización (Kyle, 1986) y es por eso que el objetivo principal de este trabajo es diseñar un protocolo de preparación de muestras que asegure la eliminación de ese aporte químico diagenético antes de realizar el análisis mediante la técnica PIXE. Una técnica que no siendo la más común en este tipo de estudios (Shafer et al., 2008), es aplicada en el análisis de muestras óseas arqueológicas (Elliott & Grime, 1993; Gaschen et al., 2008; Goodwin et al., 2007; Müller & Reiche, 2011; Reiche et al., 1999) y presenta la ventaja de ser una técnica no destructiva.

2. METODOLOGÍA

Antes de comenzar a describir la metodología empleada en este ensayo, resulta interesante destacar que la composición química de los mismos se modifica con el curso de la vida del animal (Fernández-Tresguerres et al., 2006) y que las concentraciones de los elementos no sólo son diferentes en los distintos huesos del esqueleto (Brätter et al., 1977), sino que también varían dentro de la estructura del mismo (Carvalho et al., 2004). Además de comprobarse que

¹ El proceso de fosilización está dividido en dos fases separadas por el enterramiento (López & Truyols; 1994): fase bioestratinómica y fase diagenética.



Figura 1- Esqueleto casi completo de un asno en el yacimiento arqueológico islámico "C/ Dos aceras 42-48" en Málaga.

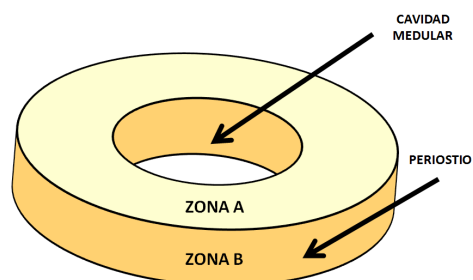


Figura 2- Los análisis por PIXE se llevaron a cabo en dos zonas del hueso, una interna y otra en el periostio. En esta última es donde se suelen analizar los huesos mediante técnicas no destructivas.

diferentes análisis realizados en un mismo hueso esponjoso presentan resultados muy dispares (Grupe, 1988), por lo que se aconseja realizar los análisis en hueso compacto (por ejemplo en las diáfisis de huesos largos), hay que tener en cuenta que dentro de dicho hueso compacto la distribución de elementos también varía transversalmente a lo largo de la pared del mismo (Carvalho et al., 2004). Por ello, siguiendo la recomendación de Grupe (1988), se seleccionaron una tibia y un fémur de un asno (*Equus asinus*; Figura 1) rescatados dentro de un horno de cerámica islámico localizado en la ciudad de Málaga (España) y datado en el siglo XIV (yacimientos arqueológicos C/ Dos Aceras 42-48; Bernáldez & Gamero, 2010). El estado de conservación de los huesos era malo y debido a su elevada porosidad presentaban una alta cantidad de partículas procedentes del suelo en el interior de su estructura; de esta forma se podría comprobar hasta qué punto son efectivos los procedimientos de limpieza. Se extrajeron muestras de unos dos centímetros de tamaño de ambos huesos y fueron tratadas siguiendo diferentes protocolos basados en los trabajos de Carvalho et al. (2004), Price et al. (1992) y Shafer et al. (2008). Los tratamientos de limpieza pueden resumirse en cuatro pasos: Paso 1: Lavado por inmersión en agua destilada en una cubeta de ultrasonidos

durante 15 minutos para eliminar los restos de matriz terrosa de la muestra. Paso 2: Lavado por inmersión en acetona o etanol en una cubeta de ultrasonidos durante 15 minutos para eliminar los componentes orgánicos del hueso. Paso 3: Lavado por inmersión en ácido acético (1 N), en ácido nítrico (0.1 N) o en una dilución (ambos a 1 M) de ácido acético-base [(NH₃OH)Cl] para eliminar compuestos inorgánicos de neoformación. Paso 4: Enjuagado con agua destilada y secado a temperatura ambiente, evitando contrastes térmicos. En total se han llevado a cabo 6 procesos de limpieza (Tabla 1), que han sido aplicados cada uno a una muestra de tibia y a otra de fémur. Las muestras óseas fueron analizadas en la cámara universal mediante la técnica PIXE en el Centro Nacional de Aceleradores (CNA). Se irradiaron con un haz de protones de 3 MeV de energía y con 1 mm de diámetro; los rayos X procedentes de la muestra fueron recogidos en un detector Si(Li) (área 30 mm², ventana de 8 µm de Be, resolución 145 eV) situado a 45° respecto de la normal de la muestra. Para la cuantificación se utilizó el programa GUPIXWIN (Campbell et al., 2010), utilizando como muestras de referencia un patrón de ceniza de hueso (NIST Bones1400) y otro de vidrio (NIST Glass1412).

Tabla 1- Descripción de los procesos de limpieza llevados a cabo en cada muestra de tibia (T) y de fémur (F).

Muestra	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
F1	Agua destilada	Acetona	Ácido nítrico	Agua destilada
F2				
T1		Etanol	Ácido-Base	
T4				
F5		Etanol	Ácido-Base	
T5				
F3		Acetona	Ácido acético	
T2				
F4		Etanol	Ácido acético	
T7				
T3		Acetona	Ácido acético	
F7				

Tabla 2- Concentración (% en peso) de los diferentes elementos analizados en la parte interna de los huesos y tratados con ácido nítrico. Entre paréntesis se indica la incertidumbre.

Elemento	F1	F2	T1	T4
Si	0,309 (94)	0,270 (84)	0,258 (80)	0,287 (78)
Mn	0,155 (10)		0,0749 (86)	0,0677 (86)
S	0,513 (40)	0,468 (37)	0,305 (34)	0,465 (34)
Cl	0,083 (13)	0,093 (12)	0,048 (10)	0,079 (11)
Fe	1,979 (26)	1,870 (25)	3,176 (35)	3,857 (40)
Cu		0,0091 (31)		
Zn				0,0110 (37)
Sr	0,099 (14)	0,065 (12)	0,077 (16)	0,060 (12)
Pb		0,051 (16)		
P	9,303 (56)	7,770 (53)	7,753 (49)	7,399 (48)
Ca	23,48 (14)	20,47 (14)	18,18 (12)	18,86 (12)

Cada muestra de hueso se ha analizado en la parte interna (Figura 2, zona A), y en la parte externa (Figura 2, zona B). Para valorar la eficacia de los distintos protocolos diseñados se analizaron las muestras antes² y después del proceso de limpieza, junto con la tierra en la que habían estado enterrados.

² La parte externa de los huesos había sido cepillada durante el estudio paleobiológico (Bernáldez & Gamero, 2010).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ENSAYO DE LIMPIEZA

3.1.1 ANÁLISIS EN LA PARTE INTERNA DEL HUESO

El hueso está compuesto por agua, sales inorgánicas y materia orgánica. En relación con otros tejidos la proporción de agua es baja, en torno al 20% de su masa total, el restante 80% está compuesto por materia sólida. De este porcentaje, dos tercios son sales minerales: fosfato de calcio, carbonato de calcio, fosfato de magnesio y fluoruro de calcio; y un tercio corresponde al componente

orgánico: fibras osteocolágenas unidas entre sí por mucopolisacáridos ácidos (Davis, 1989). El mineral principal de este tejido es la hidroxiapatita fosfocálcica $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, no obstante, existen otros elementos que se encuentran de manera natural en el hueso en diferentes cantidades (Apostoli et al. 2009; Carvalho, Brito & Barreiros, 1998; Zaichick & Zaichick, 2010).

De todos los elementos detectados por PIXE (Ca, P, Si, Mn, S, Cl, Fe, Cu, Zn, Sr, Pb), sólo el Si y el Pb no formarían parte de los componentes normales presentes en un hueso. Mientras que el Pb podría ser un elemento incorporado por bioacumulación, el Si proviene del suelo, ya que es uno de los principales

elementos que componen las arenas y arcillas. Por lo tanto, detectar trazas de Si en una muestra indicaría la poca eficacia del tratamiento de limpieza, ya que ese Si estaría relacionado con la presencia de partículas de tierra en los poros. En todas las muestras preparadas con ácido nítrico (F1, F2, T1 y T4) se han detectado trazas de Si (Tabla 2), por lo que se considera que el tratamiento no ha eliminado completamente la contaminación diagenética. Este es el motivo por el cual no se pueden tener garantías de que las concentraciones de Mn, Cu, Zn y Pb no estén en parte justificadas por una contaminación *post-mortem*. Otro parámetro relacionado con un aporte mineralógico durante

Tabla 3- Concentración (% en peso) de los elementos traza presentes en la parte externa e interna de las muestras de hueso estudiadas. Entre paréntesis se indica la incertidumbre.

Elemento		F5	T5	F3	T2	F4	T7	T3	F7
Si	Ex	0,259 (84)	0,301 (93)	0,277 (89)	0,316 (97)		0,310 (78)		
	In								
Mn	Ex						0,036 (90)	0,04 (10)	
	In						0,033 (11)		
S	Ex	0,762 (51)	0,800 (53)	0,641 (52)	0,596 (54)	1,671 (48)	1,440 (53)	1,105 (60)	0,794 (54)
	In	0,362 (39)	0,319 (43)	0,331 (37)	0,301 (45)	0,347 (40)	0,306 (44)	0,203 (38)	0,581 (51)
Cl	Ex	0,279 (18)	0,083 (19)	0,402 (18)	0,372 (20)				
	In	0,481 (14)	0,388 (14)	0,414 (13)	0,297 (14)	0,068 (12)	0,053 (14)	0,036 (10)	0,118 (16)
Fe	Ex	0,989 (17)	1,490 (25)	0,771 (15)	1,661 (27)	0,992 (16)	1,796 (33)	1,361 (29)	0,687 (20)
	In	1,086 (18)	2,682 (31)	1,118 (19)	1,583 (22)	0,991 (17)	2,417 (35)	1,733 (23)	1,075 (22)
Cu	Ex		0,0122(39)			0,0138(32)	0,0230(50)	0,0200(50)	
	In		0,0089(31)						
Zn	Ex	0,0163(41)	0,0169(43)	0,0142(29)	0,0163(42)	0,0228(32)	0,0310(60)	0,0380(60)	0,019 (16)
	In	0,0088(26)				0,0125(29)			0,0140(40)
Sr	Ex	0,109 (13)	0,084 (15)	0,105 (12)	0,101 (14)	0,096 (13)	0,070 (17)	0,082 (17)	0,062 (16)
	In	0,069 (12)	0,072 (13)	0,081 (14)	0,084 (12)	0,078 (12)	0,082 (18)	0,063 (12)	0,115 (17)
Pb	Ex	1,766 (57)	1,419 (60)	0,267 (27)	0,456 (39)	3,270 (74)	2,255 (92)	0,948 (65)	0,278 (42)
	In	0,075 (16)	0,086 (19)						

la fosilización es la relación Ca/P³, que en la zona interna de estas muestras alcanza el valor más alto, esta mayor concentración de Ca podría estar justificada por la presencia de carbonatos de neoformación en el hueso. Además, en lo que respecta al estado de conservación de las muestras, a nivel macroscópico se observa una mayor erosión en las tratadas con ácido nítrico. Por lo tanto, se descarta el uso de este ácido en la limpieza del material óseo subfósil. Los resultados obtenidos en las muestras tratadas con los otros tratamientos no parecen evidenciar elementos relacionados con el proceso de diagénesis al no detectarse Si. Sin embargo, las muestras que fueron limpiadas con etanol y ácido-base (F5, T5) tienen trazas de Pb, que no se registran en las muestras tratadas con ácido acético y presentan mayores concentraciones de Cl (Tabla 3), el cual procede de la composición de la base [(NH₃OH)Cl], por lo que se debe tener en cuenta a la hora de realizar futuras interpretaciones. A la vista de los resultados de la parte interna del hueso parece que el tratamiento con ácido acético es el mejor de los ensayados.

3.1.2 ANÁLISIS EN LA PARTE EXTERNA DEL HUESO

El análisis realizado en el periostio es el más interesante en este estudio porque es la zona en la que se llevan a cabo la mayor parte de los análisis no destructivos en huesos. Como en el caso anterior, el primer criterio a tener en cuenta para valorar la eliminación de contaminación diagenética será la presencia de Si. Según éste, sólo algunas de las muestras tratadas con ácido acético no presentan trazas de Si (Tabla 3). Por lo que partir de este momento, los tratamientos donde se utiliza ácido-base quedan descartados. Las concentraciones en la zona externa de las muestras tratadas con ácido acético (tabla 3) son mayores que las obtenidas en la parte interna del hueso con varias excepciones: Las concentraciones de Sr

y Fe son similares en ambas secciones y no se detecta Cl en el periostio. El Cu y el Pb sólo se registran en la zona externa, siendo menores las concentraciones de Pb en las muestras preparadas con acetona y ácido acético, por lo que a la vista de los resultados éste parece el mejor tratamiento. Las diferencias halladas entre las concentraciones de las zonas interna y externa del hueso, indican la conveniencia de llevar a cabo los análisis químicos en la parte interna siempre que sea posible, ya que está menos expuesta a la incorporación de elementos durante el proceso de fosilización.

3.2 ¿SE PODRÍA HABLAR DE BIOACUMULACIÓN EN LOS HUESOS DEL ASNO?

El hecho de haber estudiado muestras rescatadas en una antigua zona de alfarería aumenta la probabilidad de determinar metales exógenos en los huesos y la tierra analizada. Análisis arqueométricos llevados a cabo en cerámicas vidriadas de la Península Ibérica describen en su composición los mismos elementos determinados en los huesos estudiados. Por ejemplo, en cerámicas medievales de Madinat-Al-Zahra, datadas en el s. XI, se registraron Pb, Fe, Ca, Mg, Mn, Cu, Si y Sn en vidrios melados, blancos, verdes y negros y Si, Al, Ti, Ca, Mg, Na y K en las pastas, a partir de su análisis con EAA, DRX, XRF y SEM/EDX (González, González & González, 1992). Esta misma composición ha sido descrita en cerámica dorada del s. XI, presente en varios yacimientos arqueológicos de Zaragoza: "P^o de la Independencia", "Diputación Provincial de Zaragoza", "Fleta 2002" y "Fleta 2005". Los análisis mediante ICP-OES y SEM mostraron que las pastas tenían en su composición Na, Mg, Al, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Ba y Sr y los esmaltes Na, Mg, Al, Si, K, Ca, Fe, Sn, Pb (Ortega et al., 2012). Por todo ello, la contaminación del suelo y la de los huesos, ya sea por ingestión (suponiendo que el asno habitará en la zona de influencia de esta actividad productiva) o por contaminación diagenética podría estar justificada por la práctica alfarera llevada a cabo en ese área.

³ La proporción Ca/P es próxima a 2.15 en huesos frescos (Price et al., 1992: 520).

Durante el estudio paleobiológico del yacimiento arqueológico "C/ Dos Aceras 42-48" de Málaga se realizaron análisis mediante la técnica PIXE de algunos huesos del mismo asno (Bernáldez & Gamero, 2010). Al igual que en el trabajo de Vuorinen, Tappe & Mussalo-Rauhamaa (1990), sólo se limpiaron las muestras mediante cepillado de la capa externa y el resultado fue una ingente cantidad de metales que presumiblemente habrían sido ingeridos por el animal en vivo (similares a los resultados obtenidos en F6 y T6, Tabla 4). No obstante, se analizó también la matriz terrosa y como se observa en la Tabla 4 dichos metales también se encontraron en el sustrato, por lo que probablemente parte de los elementos registrados en los huesos proviniesen de una contaminación externa durante la diagénesis. Sin embargo, no se podía desechar la idea de que hubiera algún tipo de contaminación en vida del asno porque no se podían discriminar cuáles eran los elementos intrusivos ni qué cantidades provenían de la diagénesis (Carvalho & Marques, 2008; Carvalho et al., 2004; Patterson et al., 1991; Rebôcho et al., 2006; Zapata et al., 2006). Posteriormente se limpiaron utilizando el procedimiento descrito anteriormente, acetona y ácido acético, y los resultados de PIXE en la parte interna (T3 y F7) no mostraron trazas de Si, Mg, Al, K, Ti, Cr, Mn ni Pb, contrariamente a los resultados de los análisis realizados en las muestras que sólo fueron cepilladas (Tabla 4). Unos elementos incorporados al hueso durante el proceso de fosilización y que certifican, en parte, la validez del protocolo de limpieza. Por otro lado, las cantidades de otros elementos como Zn, Cl y Sr son similares a las concentraciones obtenidas en los huesos de un caballo actual (Reiche et al., 1999), por lo que estos valores se podrían asumir como normales en los huesos de un equino. También podría tratarse de valores normales los detectados para S, aunque son algo mayores que los obtenidos para el caballo actual. En lo que respecta al Fe, los datos obtenidos están entre el 1% y el 2%, sin embargo es difícil determinar el origen de este elemento porque las concentraciones de hierro en huesos humanos actuales varían de 0,01% a 5,9% (Apostoli et al., 2009;

Carvalho et al, 1998; Zaichick & Zaichick, 2010). Por lo tanto, se necesita un estudio más profundo de la presencia de Fe en équidos para poder interpretar correctamente este registro. Por último, cabe destacar el Pb como elemento bioacumulable en el hueso, ya que la mera presencia del mismo indicaría una contaminación ambiental relacionada con la producción cerámica (el Pb es uno de los componentes principales del vidriado). Sin embargo, en ninguna de las dos muestras analizadas se detecta Pb. Probablemente este animal no vivió en la zona, sino que depositado en el horno una vez finalizada la actividad alfarera y por eso no incorporó trazas de metales en su organismo.

Tabla 4- Resultados del análisis PIXE del exterior de dos muestras control que sólo fueron limpiadas mediante cepillado. Elementos como el Ti, Cr o Mg no se detectan en las muestras limpias y sí en las muestras de tierra (T5T6). Entre paréntesis se indica la incertidumbre.

Elemento	F6	T6	T5T6
Mg	0,84 (10)	1,17 (12)	1,193(90)
Al	3,189 (87)	5,24 (11)	5,82(31)
Si	4,890 (81)	9,180 (97)	24,1(12)
P	7,974 (71)	7,665 (63)	
S	0,675 (40)	0,687 (37)	0,053(24)
K	0,252 (24)	0,499 (26)	1,661(90)
Ca	23,07 (18)	24,80 (16)	6,336 (52)
Ti	0,087 (17)	0,129 (14)	0,292(18)
Cr		0,040 (11)	0,066 (10)
Mn		0,0593 (95)	0,0210(41)
Fe	1,231 (22)	2,275 (29)	2,48(13)
Cu	0,0389 (83)	0,0216 (42)	0,0173(31)
Zn	0,0237 (80)	0,0254 (45)	
Sr	0,095 (14)	0,070 (12)	0,0223(60)
Pb	1,878 (68)	1,425 (52)	0,252(30)

4. CONCLUSIONES

La validez de la técnica empleada ya había sido corroborada en investigaciones anteriores, por lo que la primera de las conclusiones que se podrían extraer de este estudio es el diseño del protocolo de preparación que se aplicará en las

muestras en el futuro. Este consiste en una secuencia de lavados de 15 minutos en una cubeta de ultrasonidos que se comienza con un primer lavado por inmersión en agua destilada, se continúa por uno con acetona y se termina con otro en ácido acético. Posteriormente, se lleva a cabo un enjuagado con agua destilada y se deja secar a temperatura ambiente. La segunda conclusión está relacionada con la zona del hueso en la que se deben realizar los análisis. Al igual que otros estudios, en este caso se han detectado diferencias en la concentración de elementos traza entre la zona interna y externa del hueso. El periostio, presenta mayores concentraciones de metales, por lo que podría no estar completamente limpio. Esta zona es la que está en contacto con el sustrato y en la que la contaminación diagenética sería mayor, por lo tanto los análisis deberían llevarse a cabo en la parte interna del hueso, siempre que fuera posible. Por último, el grado de polución detectado en la zona alfarera se ha obtenido a partir del análisis del suelo, aunque cabría desechar esta posibilidad la bioacumulación de metales en el esqueleto del asno analizado, puesto que las concentraciones obtenidas de los metales se encuentran dentro de los niveles normales en huesos actuales de caballo. Queda pendiente de un estudio pormenorizado la presencia de Fe, debido a la alta variabilidad detectada en los estudios de concentraciones de este elemento en huesos humanos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación proporcionada por la Junta de Andalucía al Proyecto de Excelencia "Nuevo enfoque técnico-metodológico para la conservación y conocimiento del patrimonio arqueológico orgánico: Paleobiología, ADN antiguo y análisis físico-químicos".

BIBLIOGRAFÍA

Aléx, E., Nocete, F., Nieto, J.M., Sáez, R. & Bayona, M.R. 2004. "Estudio del impacto medioambiental de la metalurgia prehistórica en el Andévalo onubense: contaminación

de las aguas, deforestación y erosión". In F. Nocete, (coord.), *Odiel. Proyecto de investigación arqueológica para el análisis del origen de la desigualdad social en el suroeste de la Península Ibérica* (pp 325-342). Sevilla: Arqueología Monografías. Junta de Andalucía.

- Apostoli, P., De Palma, G., Catalani, S., Bortolotti, F. & Tagliaro, F. 2009. "Multielemental analysis of tissues from Cangrande della Scala, Prince of Verona, in the 14th century". *Journal of Analytical Toxicology*, 33, 322-327.
- Arnay-De-La-Rosa, M., Gonzalez-Reimers, E., Velasco-Vazquez, J., Galindo-Martin, L., Delgado-Ureta, E., Santolaria-Fernandez, F. & Barros-Lopez, N. 1998. "Comparison of bone lead in Pre-Hispanic, 18th century and modern population of Tenerife". *The Science of the Total Environment*, 209, 107-111.
- Baranowska, I., Czernickib, K. & Aleksandrowicz, R. 1995. "The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the Upper Silesian industrial district". *The Science of the Total Environment*, 159, 155-162.
- Barone, R. (1999). *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 1, Ostéologie*. París: Vigot.
- Bernaldez, E. y Gamero, M. 2010. *Informe paleobiológico de la Calle Dos Aceras 42-48 (Málaga)*. Informe inédito.
- Bernaldez, E., García-Viñas, E., Gómez, A., Ontiveros, E. & Rodríguez, M.N. 2013. "Retazos de la alimentación, salubridad y contaminación ambiental en un buque del s. XIX. Análisis paleobiológico y tafonómico de los restos faunísticos del Fougueux - Pecio de Camposoto (Cádiz)". In X. Nieto, A. Ramírez & P. Recio (Coord.), *Actas del I congreso de arqueología naval y subacuática* (pp 1109-1119). Madrid: Ministerio de Educación, cultura y Deporte.
- Bräter, P., Garwlik, D., Lausch, J. & Rösick, U. 1977. "On the distribution of trace elements in human skeletons". *Journal of Radioanalytical Chemistry*, 37, 393-403.
- Campbell, J.L., Boyd, N.J., Grassi, N., Bonnick, P. & Maxwell, J.A. (2010). *NIMB268*, 3356-3363.
- Carvalho, M.L. & Marques, A.F. 2008. "Diagenesis evaluation in Middle Ages human bones using EDXRF". *X-Ray Spectrom*, 37, 32-36.
- Carvalho, M.L., Marques, A.F., Lima, M.T. & Reus, U. 2004. "Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from Middle Age by total reflection X-ray fluorescence". *Spectrochimica Acta Part B* 59, 1251- 1257.
- Carvalho, M.L., Brito, J. & Barreiros, M.A. 1998. "Study of trace element concentrations in human tissues by EDXRF Spectrometry". *X-ray Spectrometry*, 27, 198-204.
- Davis, S.J.M. 1989. *La arqueología de los animales*. Barcelona: Bellaterra.
- Elliott, T.A. & Grime, G.W. 1993. "Examining the diagenetic alteration of human bone material from a range of archaeological

- burial sites using nuclear microprobe". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 77, 537-547.
- Farnum, J., Glascock, M., Sanford M. & Gerritsen, S. 1995. "Trace elements in ancient human bone and associated soil using NAA". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 196, 267-274.
- Fernández-Tresguerres, I. Alobera, M.A., Del Canto, M. y Blanco, L. 2006. "Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo". *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11, 47-51.
- Gaschen, A.A.M., Döbeli, M., Markwitz, A., Barry, B., Ulrich-Bochsler, S. & Krähenbühl, U. 2008. "Restrictions on fluorine depth profiling for exposure age dating in archaeological bones". *Journal of Archaeological Science*, 35, 535-552.
- Glimcher, M.J. 1998. "The Nature of the Mineral Phase in Bone: Biological and Clinical Implications". In L.V Avoli., & S.M. Krane, (Ed.), *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders* (pp. 23-50). Elsevier.
- González, F., González, M. & González, C. 1992. "Estudio arqueométrico de algunas cerámicas medievales de Madinat Al-Zahra (Córdoba)". *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 31, 641-498.
- González-Reimers, E., Velasco-vázquez, J., Aray-De-La-Rosa, M., Alberto-Barroso, V., Galindo-Martín, L. & Santolaria-Fernández, F. 2003. "Bone cadmium and lead in prehistoric inhabitants and domestic animals from Gran Canaria". *The Science of the Total Environment*, 301, 97-103.
- Goodwin, M.B., Grant, P.G., Bench, G. & Holroyed, P.A., 2007. "Elemental composition and diagenetic alteration of dinosaur bone: distinguishing micron-scale spatial and compositional heterogeneity using PIXE". *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 253, 458-476.
- Grattan, J., Huxleya, S., Karakib, L.A., Tolanda, H., Gilbertsonc, D., Pyattd, B. & Al Saadb, Z. 2002. "Death...more desirable than life'? The human skeletal record and toxicological implications of ancient copper mining and smelting in Wadi Faynan, southwestern Jordan". *Toxicol. Ind. Health*, 18, 297-307.
- Grupe, G. 1988. "Impact of the choice of bone samples on the trace element data in excavated human skeletons". *Journal of Archaeological Science*, 15, 123-129.
- Hedges, R.E.R. 2002. "Bone diagenesis: an overview of processes". *Archaeometry*, 44, 319-328.
- Kyle, J.H. 1986. "Effect of Post-burial Contamination on the Concentrations of Major and Minor Elements in Human Bones and Teeth - The Implications for Palaeodietary Research". *Journal of Archaeological Science*, 13, 403-416.
- López, N. & Truyols, J. 1994. *Paleontología*. Madrid: Editorial Síntesis.
- Martínez-García, M.J., Moreno, J.M., Moreno-Clavel, J., Vergara, N., García-Sánchez, A., Guillamón, A., Portí, M. & Moreno-Grau, S. 2005. "Heavy metals in human bones in different historical epochs". *Science of Total Environment*, 348, 51-72.
- Müller, K. & Reiche, I. 2011. "Differentiation of archaeological ivory and bone materials by micro-PIXE/PIGE with emphasis on two Upper Palaeolithic key sites: Abri Pataud and Isturitz, France". *Journal of Archaeological Science*, 38, 3234-3243.
- Nocete, F. 2006. "The first specialized copper industry in the Iberian Peninsula: Cabezo Juré (2900-2200 BC)". *Antiquity*, 80, 646-654.
- Nocete, F., Álex, E., Nieto, J.M., Sáez, R. & Bayona, M.R. 2005. "An archaeological approach to regional environmental pollution in the south-western Iberian Peninsula related to Third millennium BC mining and metallurgy". *Journal of Archaeological Science*, 32, 1566-1576.
- Ortega, J.M., Gutiérrez, F.J., Pérez-Arantegui, J. & Déléry, C. 2012. "La cerámica dorada en el noroeste de la Península Ibérica: taifas de Zaragoza y Albarracín". *Actas del I Congreso Internacional Red Europea de Museos de arte Islámico*, 219-251.
- Patterson, C., Ericson, J., Manea-Krichen, M. & Shirahata, H. 1991. "Natural skeletal levels of lead in *Homo sapiens sapiens* uncontaminated by technological lead". *The Science of the Total Environment*, 107, 205-236.
- Price, T.D., Blitz, J., Burton, J. & Ezzo, J.A. 1992. "Diagenesis in Prehistoric Bone: Problems and Solutions". *Journal of Archaeological Science*, 19, 513-529.
- Rebôcho, J., Carvalho, M.L., Marques, A.F., Ferreira, F.R. & Chettle, D.R. 2006. "Lead post-mortem intake in human bones of ancient populations by ¹⁰⁹Cd-based X-ray fluorescence and EDXRF". *Talanta*, 70, 957-961.
- Reiche, I., Favre-Quattropiani, L., Calligaro, T., Salomon, J., Bocherens, H., Charlet, L. & Menu, M. 1999. "Trace element composition of archaeological bones and postmortem alteration in the burial environment". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 150, 656-662.
- Shafer, M.M., Sikerb, M., Overdier, J.T., Ramsic, P.C., Teschler-Nicolad, M. & Farrell, P.M. 2008. "Enhanced methods for assessment of the trace element composition of Iron Age bone". *Science of the Total Environment*, 401, 144-161.
- Trueman, C.N., Behrensmeier, A.K., Tuross, N & Weiner, S. 2004. "Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids". *Journal of Archaeological Science*, 31, 721-739.
- Vuorinen, H.S., Tappe, U. & Mussalo-Rauhamaa, H. 1990. "Trace and Heavy Metals in Infants, Analysis of Long Bones from Ficana, Italy,

- 84th Century BC". *Journal of Archaeological Science*, 17, 237-254.
- Zapata, J., Pérez-Sirvent, C., Martínez-Sánchez, M.J. & Tovar, P. 2006. "Diagenesis, not biogenesis: Two late Roman skeletal examples". *Science of the Total Environment*, 369, 357-368.
- Zaichich, S. & Zaichich, V. 2010. "The effect of age and gender on 38 chemical element contents in human iliac crest investigated by instrumental neutron activation analysis". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 1-6.