



Universidad de Valladolid



# ***Análisis de biomarcadores en contexto arqueológico: Ácidos grasos***

**Joana Pico Carbajo**

Julio 2013

Máster en Técnicas Avanzadas en Química  
Departamento de Química Analítica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Valladolid





---

**Universidad de Valladolid**

Dr. JOSÉ BERNAL DEL NOZAL, Profesor del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid.

CERTIFICA: Que la presente memoria, "**Análisis de biomarcadores en contexto arqueológico: ácidos grasos**" ha sido realizada bajo su dirección en el grupo de investigación TESEA, perteneciente al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, en el Instituto CINQUIMA, por **D<sup>a</sup>. Joana Pico Carbajo** y constituye su Trabajo Fin de Máster para optar al título de *Máster en Técnicas Avanzadas en Química* de la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 10 de Julio de 2013,

Fdo: D. José Bernal del Nozal

A mi madre, mi hermano y a Agustín por el apoyo recibido en todo momento y en especial a ti, Rodrigo, por estar siempre a mi lado.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, bajo la dirección del Dr. José Bernal del Nozal, a quien expreso mi agradecimiento por su asesoramiento y enseñanzas.

Hago extensivo mi agradecimiento al Director del Grupo de Investigación TESEA, el Dr. José Luis Bernal Yagüe, por brindarme la oportunidad de participar en esta investigación y ayudarme a mejorar día a día mi formación. Igualmente, agradezco a todos los miembros del Grupo de Investigación TESEA su ayuda y consejos en el momento en que los he necesitado.

Por último, me gustaría agradecer al Dr. Carmelo Prieto Colorado del Departamento de Física de la Materia Condensada, Cristalografía y Mineralogía de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, su ayuda y asesoramiento con las muestras arqueológicas.

---

<b>1. Introducción y objetivos</b> .....	<b>Pg.7</b>
<b>2. Antecedentes bibliográficos</b> .....	<b>Pg.11</b>
<b>3. Reactivos e instrumentación</b> .....	<b>Pg.17</b>
3.1. Reactivos y disolventes .....	pg.17
3.2. Patrones comerciales .....	pg.17
3.3. Instrumentación .....	pg.18
3.3.1 Equipo cromatográfico .....	pg.18
3.3.2 Material de laboratorio y otros equipos empleados.....	pg.19
<b>4. Parte experimental</b> .....	<b>Pg.21</b>
4.1. Compuestos estudiados .....	pg.21
4.2. Preparación de las disoluciones patrón .....	pg.22
4.3. Determinación cromatográfica .....	pg.24
4.4. Identificación de los compuestos estudiados .....	pg.28
4.5. Optimización del tratamiento de muestra .....	pg.31
4.6. Eficacia de la extracción con hexano y elección del método final .....	pg.33
<b>5. Validación del método analítico</b> .....	<b>Pg.40</b>
5.1. Selectividad .....	pg.40
5.2. Límites de detección (LOD) y Límites de cuantificación (LOQ) .....	pg.41
5.3. Intervalo lineal .....	pg.42
5.4. Efecto matriz .....	pg.44
5.5. Precisión: repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia .....	pg.46
<b>6. Aplicación del estudio al análisis de muestras</b> .....	<b>Pg.53</b>
<b>7. Conclusiones generales</b> .....	<b>Pg.59</b>
<b>8. Simbología empleada</b> .....	<b>Pg.61</b>
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>Pg.63</b>

## **1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

## **1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

Los biomarcadores, también denominados como marcadores biológicos o indicadores químicos, se definen como aquellos compuestos químicos (lípidos, proteínas, carbohidratos, oxalatos...) cuya presencia o ausencia determina la funcionalidad de un objeto. Son de gran importancia en el contexto de la Arqueología, y en general, del patrimonio cultural. Como es bien conocido, la Arqueología es una ciencia que estudia los cambios que se producen en la sociedad a través de restos materiales distribuidos en el espacio y contenidos en el tiempo. Por lo tanto, es necesario realizar un análisis de estos restos e identificar unos biomarcadores que permitan relacionar un objeto con el uso del que se le dio en el pasado; es en este punto cuando la Química, y en especial la Química Analítica, puede demostrar su capacidad para llevar a cabo esta tarea.

La relación entre la Química y la Arqueología comenzó a principios del siglo XIX. El primer análisis de un objeto arqueológico podría atribuirse a Klaproth (1743-1817), el cual determinó gravimétricamente la composición aproximada de seis monedas romanas y de nueve griegas, una serie de objetos metálicos y alguna pieza de vidrio romano. Otros ilustres científicos como Davy (1778-1829) y Faraday (1791-1867) también contribuyeron al análisis arqueológico durante el siglo XIX analizando pigmentos en pinturas romanas, monedas de vidrio, bronce esmaltado así como residuos de comida y aceite. A finales de este siglo (1895), Richards realizó el primer análisis químico húmedo de una muestra arqueológica, en concreto de una vasija griega. Por último, es importante señalar que Carnot (1839-1920) desarrolló el método de datación basado en flúor, demostrando que los huesos y dientes acumulan el flúor de la tierra, por lo que su contenido en dicho elemento podría indicar su edad geológica [1]. El desarrollo tecnológico debido a la Segunda Guerra Mundial, propició la aparición de nuevas técnicas analíticas (Rayos X, Microscopía electrónica, Análisis por activación neutrónica, Espectroscopía Raman y de Infrarrojo, Espectrometría de masas...) que permitieron el análisis de materiales arqueológicos a mayor escala, y lo que es más importante, alguna de estas técnicas permitía el análisis no destructivo de las muestras [1]. Posteriormente, el desarrollo de la Cromatografía de gases (GC) en la década de 1950 [2] y de la Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) alrededor 1965 [3], permitió además de la aplicación de las mismas al análisis de restos arqueológicos a mayor escala, la separación y el análisis más individualizado de los residuos biológicos y orgánicos (biomarcadores) para extraer más información acerca del uso e historia de los mismos.

Por tanto, las técnicas cromatográficas han sido especialmente importantes para analizar residuos orgánicos, ya que han permitido identificar la naturaleza y origen de dichos restos. Teniendo en cuenta que las diferentes plantas y animales producirán distintos tipos y cantidades de compuestos orgánicos, poder separarlos e identificarlos de manera inequívoca permitirá disponer de mucha más información a la hora de catalogar los distintos restos de acuerdo a su uso en el pasado [4].

En particular, se han empleado para este propósito la Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de diodos alineados (LC-DAD) y de espectrometría de masas (HPLC-MS) [5].

Como se ha comentado anteriormente, los biomarcadores más utilizados para el estudio de restos arqueológicos han sido los lípidos (tanto ácidos grasos libres, como acilglicéridos, terpenos y esteroides entre otros compuestos), alcanos, DNA, proteínas, carbohidratos, aminoácidos [6], e incluso compuestos orgánicos volátiles [7] y polifenoles [8].

La susceptibilidad de estas biomoléculas a su modificación estructural y degradación sigue el orden que se muestra a continuación: nucleótidos > proteínas > carbohidratos > lípidos [6], y puede variar dependiendo de los factores medioambientales. Es interesante reseñar que las sustancias más polares se degradan con mayor facilidad al estar enterradas, debido a la lixiviación del agua, y que este proceso es más importante si contienen elementos esenciales como N y P; por ello, los lípidos sobreviven mejor en contextos arqueológicos al ser hidrofóbicos [6].

Estos biomarcadores se han encontrado en multitud de objetos en contexto arqueológico [9] y se han analizado fundamentalmente por GC o HPLC, aunque también se han realizado estudios donde se ha utilizado la Cromatografía iónica [10] o de exclusión [11]. Sin embargo de entre todos ellos, gran parte de la bibliografía se centra en el estudio de los ácidos grasos, cuyo uso como biomarcadores fue descrito por primera vez en la década de 1970 [12]. Estos compuestos se han analizado principalmente en vasijas, aunque también han sido encontrados en cosméticos y pinturas, como se comentará posteriormente en el apartado 2 de esta memoria. La técnica más ampliamente utilizada para el análisis de ácidos grasos en matrices arqueológicas ha sido GC-MS. No sólo se estudian los ácidos grasos, sino también sus productos de degradación térmica como las cetonas de cadena larga y los ácidos  $\omega$ -(*o*-alquilfenil) alcanóicos [6, 13], los hidroxiaácidos de ácidos grasos y los ácidos  $\alpha$ ,  $\omega$  dicarboxílicos [14, 15, 16].

En el caso particular del estudio de la composición de ácidos grasos en vasijas, es posible distinguir fundamentalmente el tipo de alimento consumido o almacenado ya que estos compuestos se encuentran en prácticamente todos los alimentos; ha de tenerse en cuenta que la elevada temperatura empleada para cocinar aumenta la fluidez de los mismos, lo que facilita su absorción en los recipientes y a su vez permite que se pueda analizar con menor dificultad [17]. Una vez identificados los ácidos grasos presentes en la muestra, se puede crear un perfil de ácidos grasos, y utilizarlo para discernir cuál fue el posible uso que se le dio a ese objeto [4, 18].

No obstante, hay algunos problemas a la hora de interpretar estos resultados de perfiles de ácidos grasos, debido a que no todos los ácidos grasos se degradan de igual forma (los insaturados antes que los saturados, aumentando la velocidad casi 10 veces por cada doble enlace [19]), ni se lixivian del mismo modo (el C16:0 es dos veces más soluble en agua a 20°C que el C18:0 [20]). Además, se debe tener precaución durante la toma de muestra debido a que se concentran más lípidos en las partes superiores de la vasija que en la base [13], y por lo tanto si la muestra no es representativa se pueden producir resultados poco reproducibles e incorrectos.

Se trata, por tanto, de un análisis complejo ya que la matriz biológica (resto arqueológico) se ve alterada por el enterramiento (biodegradación, lixiviación e impregnación de tierra o agua de los alrededores) [13, 21, 22] u otros factores como puede ser el procesado de alimentos [13, 23, 24, 25], multifuncionalidad del objeto [13, 26, 27] o mezcla con otros productos como con las ceras utilizadas para el sellado de las vasijas [28]. Sin embargo, una vez llevado a cabo el análisis de la muestra y realizada la interpretación de los resultados, evaluando la presencia o ausencia de un ácido graso o la relación entre los que se degradan de manera similar [4], se podrá deducir de una manera más precisa el posible uso que se le daban a estos objetos.

Por todo ello, el **objetivo** del presente trabajo ha sido el desarrollo y validación de un método analítico que permita la determinación simultánea mediante GC-MS de 38 ácidos grasos, tanto saturados como insaturados en muestras arqueológicas. Posteriormente, el método propuesto fue utilizado para analizar fragmentos de vasijas encontradas en tumbas de época Vaccea del yacimiento de Pintia (Padilla de Duero, Valladolid) y muestras de pintura mural correspondientes a varias iglesias de la comarca de Sayago (Zamora). Como ya se ha indicado, es necesario el estudio de los fragmentos de vasijas para conocer el contenido de las mismas y así poder comprender las funciones de los objetos, sus posibles áreas de actividad y poder relacionarlo con las costumbres funerarias del pueblo Vacceo. Mientras que la importancia del análisis de las pinturas murales radica en determinar la técnica que se empleó en la realización de dicho mural, lo que facilita a su vez la selección de las medidas de conservación oportunas.

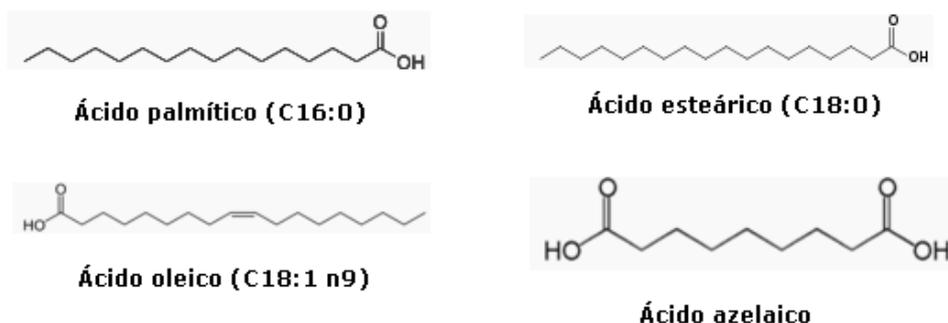
## **2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

## 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Los ácidos grasos son biomoléculas pertenecientes al grupo de los lípidos, y se caracterizan químicamente por ser una cadena hidrocarbonada terminada en un grupo carboxílico (ácidos orgánicos). Los ácidos grasos se pueden clasificar según su estructura [29]: **i)** saturados de cadena lineal; **ii)** mono-insaturados de cadena lineal (*cis* y *trans*); **iii)** poli-insaturados con un metileno entre dobles enlaces (familias  $\Omega$ -6 y  $\Omega$ -3); **iv)** poli-insaturados conjugados y con más de un metileno entre dobles enlaces; **v)** de cadena ramificada; **vi)** cíclicos; **vii)** con grupos hidroxilo, epoxi, furano, ceto o nitro. Las estructuras y posibles fuentes de los principales ácidos grasos que se utilizan como biomarcadores se muestran a continuación [30]:

**Tabla 1.** Principales ácidos grasos de las muestras analizadas.

ÁCIDO GRASO	Nombre común	Fuente más común
C10:0	Ácido cáprico	Leche de rumiantes
C12:0	Ácido laúrico	Aceite de coco y palma
C16:0	Ácido palmítico	En todas las grasas
C17:0	Ácido margárico	Grasas de rumiantes
C18:0	Ácido esteárico	Grasas animales, cacao
C22:0	Ácido behénico	Ceras
C18:1 (n9)	Ácido <i>cis</i> -oleico	Aceites vegetales
C18:1 (n7)	Ácido <i>cis</i> -vaccénico	Grasas de rumiantes
C18:2 (n6)	Ácido linoleico	Aceites vegetales
Ácido nonanodioco (ácido $\alpha,\omega$ dicarboxílico)	Ácido azelaico	Aceite de semillas, por oxidación del C18:1, C18:2 y C18:3



**Figura 1.** Estructura de algunos ácidos grasos.

Los ácidos grasos desempeñan fundamentalmente tres funciones biológicas en los seres vivos [31]:

- Los ácidos grasos son componentes fundamentales de los fosfolípidos y esfingolípidos, moléculas que forman la bicapa lipídica de las membranas de todas las células.
- Los ácidos grasos son moléculas muy energéticas y necesarias en todos los procesos celulares en presencia de oxígeno, ya que por su contenido en hidrógenos pueden oxidarse en mayor medida que los glúcidos u otros compuestos orgánicos que no están reducidos.
- Algunos ácidos grasos son precursores de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, moléculas con una gran actividad biológica, que intervienen en la regulación y control de numerosos procesos vitales, como la respuesta inflamatoria, regulación de la temperatura corporal, etc.

Los ácidos grasos de interés biológico poseen normalmente un número par de átomos de carbono [32], aunque algunos ácidos grasos de cadena impar se encuentran en la leche y grasa de los rumiantes, procedentes del metabolismo bacteriano del rumen, y en algunos vegetales que no suelen ser utilizados para la obtención de aceites [34]. Los ácidos grasos saturados abundan más en los animales terrestres [32], y elevan el nivel del colesterol LDL [31]; mientras que los ácidos grasos insaturados son más abundantes en las plantas, como el C18:1(n9) propio del aceite de oliva, que disminuye el nivel del colesterol LDL [31]. En los ácidos grasos saturados, los hidrógenos en los enlaces simples se encuentran en disposición *trans*, mientras que los dobles enlaces adoptan casi siempre una posición *cis*; existen, sin embargo, ácidos grasos insaturados *trans* que proceden de manera natural de la leche y carne de los rumiantes [32], y en algunas plantas y vegetales [33]. Cuando hay más de un doble enlace en la estructura del ácido graso, normalmente no se dan de forma conjugada sino que suele aparecer un metileno entre ellos [32]; sin embargo, en la actualidad están cobrando especial relevancia los ácidos linolénicos conjugados (CLA), que según el isómero del que se trate, puede tener efectos antioxidantes, anticancerígenos y antiaterogénicos [31].

Como ya se indicó en la introducción, cuando se utilizaron en el pasado materias naturales orgánicas que contenían ácidos grasos, éstos quedaron impregnando las paredes de los recipientes donde se almacenaron o cocinaron, o en el caso de pinturas o textiles donde se emplearon; la recuperación actual de estos restos orgánicos y su posterior análisis químico, permitirá extraer conclusiones acerca del uso y funcionalidad del objeto y facilitará un mayor conocimiento de nuestro pasado.

Como se ha comentado anteriormente, GC-MS ha sido la técnica más utilizada para el análisis de ácidos grasos en matrices arqueológicas. De los más de 77 artículos publicados donde se han analizado ácidos grasos en objetos arqueológicos desde 2007 hasta la actualidad, en 69 de ellos se utilizaba GC como técnica analítica y tan sólo 8 lo hacían por HPLC. Entre los que utilizaron GC, el detector elegido en 61 de ellos fue el MS, en 10

utilizaron el detector de ionización de llama (FID) y en otros 15 se utilizó el detector de espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS); como puede deducirse de estos datos, en alguno de estos estudios se utilizó más de un detector a la hora de determinar los ácidos grasos.

GC-MS ha sido empleada fundamentalmente para el análisis de ácidos grasos en vasijas que contenían restos de alimentos vegetales o animales [4, 6, 9, 13, 14, 16, 23, 24, 25, 27, 35, 36, 37, 38, 39], aunque también se han analizado estos compuestos en utensilios de un molino [40], cuadros [41, 42, 43], esculturas [44, 45], barniz de un violín [46], artefactos líticos [19, 47], recipientes que contuvieron algún ungüento o medicina [26, 48, 49], restos de cosméticos [50], tinta [51], restos de tejido humano [52] y otros objetos de interés arqueológico [34, 53, 54, 55]. Técnicas derivadas de la GC-MS también han sido utilizadas, como la GC-MS con pirólisis (Py/GC-MS) para el análisis de ácidos grasos en la pintura de un crucifijo [89] o de un cuadro [57], en medicinas [58], en adhesivos [59] y también en residuos de alimentos en vasijas [15, 18, 21, 37]. El detector FID también ha sido utilizado para analizar el contenido de ácidos grasos en vasijas [23, 60, 61, 62, 63]. Actualmente, se está utilizando cada vez más el detector IRMS, ya que permite el análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$  y la extracción más sencilla de conclusiones debido a que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  se preservan incluso después de una considerable degradación del material y pueden por ello compararse con materiales de referencia; se ha aplicado normalmente al análisis de la relación C16:0/C18:0 en vasijas [6, 13, 20, 64]. Con respecto al uso de HPLC, los pocos artículos publicados se centran en analizar ácidos grasos en ungüentos [65] o en fragmentos de vasijas [63] por HPLC-MS y en obras de arte con detectores FLD, DAD y MS [55, 66].

En cualquier caso, antes de realizar el análisis cromatográfico de estos compuestos es necesario extraer los ácidos grasos de la matriz, efectuar una hidrólisis de los mismos (normalmente básica, con KOH en metanol (MeOH) [37, 49, 53] aunque también se encuentran ácidos con HCl [66]) si se quieren obtener los ácidos grasos libres, y realizar una reacción de derivatización para facilitar su determinación cromatográfica. Esta reacción de derivatización en el caso de la GC consiste en convertir los ácidos grasos en moléculas que sean más volátiles para facilitar su análisis, reduciéndose además su reactividad [19]; mientras que para el análisis por HPLC, es necesario su derivatización a moléculas cromóforas cuando el detector es DAD o fluorescentes cuando la detección se realiza por FLD [66]. En el caso de utilizar HPLC-MS no es necesario realizar esta etapa de derivatización [63].

Para el caso de la GC-MS, que es la que se va a utilizar en este estudio, existen varias maneras de llevar a cabo esta derivatización (Tabla 2), si bien la más común es la metilación y obtención de los correspondientes FAMES (ésteres metílicos de ácidos grasos); ésta puede lograrse a través de diferentes reactivos [19]:

**Tabla 2.** Procedimientos de metilación más utilizados.

Técnica	Ventajas	Desventajas	Eficiencia atómica (%) <sup>1</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (MeOH)	Reactivos ampliamente disponibles	Mucho tiempo de reacción, necesidad de monitorear la reacción cuidadosamente	49,55
BF <sub>3</sub> (MeOH)	Cortos tiempos de reacción	Reactivo no muy seguro, da picos extra en el cromatograma	57,05
KOH (MeOH)+calor	Rápido y con elevado % de eficiencia atómica	Requiere extracción previa	60,60
KOH (MeOH)+vortex	Rápido y con elevado % de eficiencia atómica	Requiere extracción previa, no funciona con bajas cantidades de ácidos grasos	60,60
KOH (MeOH)+microondas	Rápido y con elevado % de eficiencia atómica	Proporciona picos extra en el cromatograma, requiere su tiempo	60,60
Dimetil carbonato (autoclave)	Reactivo "verde" y seguro	Requiere mucho tiempo y el uso del autoclave	60,00
Extracción + metilación <sup>2</sup>	Rápido y con elevado % de eficiencia atómica, reduce la preparación de muestra y posibilidad de contaminación		60,60

- 1) La eficiencia atómica se define como la eficacia de un proceso de conversión química y se calcula como: % eficacia atómica= (MW producto deseado / MW reactivo) \* 100
- 2) Extraer y derivatizar en un único paso supone añadir a la muestra MeOH +Hexano+ KOH (MeOH), agitar en el vortex, calentar a 50° C durante 15 minutos, centrifugar y separar las dos fases.

La derivatización más frecuente en GC se basa en la esterificación mediante metilación utilizando catalizadores ácidos o básicos; una de las más empleadas es con BF<sub>3</sub> en MeOH [26, 53, 63, 69], donde el trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) actúa como catalizador ácido, o con KOH en MeOH [27, 51, 63] donde el KOH actúa como catalizador básico. También se ha utilizado la metilación mediante catálisis ácida HCl en metanol [4, 38, 39], metilación con diazometano (CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) [48, 44], metilación con hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) [43] o incluso metilación por *trans*-esterificación en un único paso sin necesidad de extracción mediante el empleo del reactivo Meth Prep II (hidróxido de m-(trifluorometil fenil) trimetil amonio) [35, 45, 46].

Otra manera de derivatizar ácidos grasos en muestras arqueológicas es la silylación, y para ello el reactivo más utilizado ha sido el BSTFA (N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) [24, 37, 49], mezclas de este reactivo con trimetilclorosilano (TMCS) [25, 34, 42, 46, 48] o también el reactivo (*N*-metil-*N* (trimetilsilil) trifluoroacetamida) [23]. Un caso particular de derivatización es el utilizado para analizar mediante GC los aceites que llevaban las pinturas de los cuadros, donde se forman ésteres de alcoholes alifáticos o tert-butilmethylsilyl derivados [55]; también ha sido empleada para analizar ácidos grasos en dichas obras de arte la hidrólisis térmica seguida de la derivatización por metilación, normalmente con hidróxido de tetrametilamonio o TMSH [55].

En cuanto al proceso de extracción, el compuesto más ampliamente utilizado a la hora de extraer los ácidos grasos de los diversos restos arqueológicos ha sido el CH<sub>3</sub>Cl o mezclas del mismo con MeOH [4, 24, 25, 26, 34, 43, 63]. Aunque también se han empleado otros disolventes como el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [39, 42, 48], dietiléter [37, 49] y hexano [38, 53]. No obstante, a la hora de seleccionar los disolventes hay que tener en cuenta la solubilidad de los ácidos grasos en cada uno de ellos. La constante dieléctrica afecta a esta solubilidad, puesto que el mecanismo de interacciones soluto – disolvente depende de la polaridad y ésta de la constante dieléctrica; por ello, el disolvente óptimo será el que tenga una constante dieléctrica similar al soluto [19]. A continuación se muestran las constantes dieléctricas de algunos FAMES (Figura 2) y de los disolventes cuyas constantes dieléctricas son más similares a las de estos (Figura 3).

Dielectric constants	40 °C
Undecanoate	3.53
Laurate or dodecanoate	3.41
Tridecanoate	3.32
Myristate or tetradecanoate	3.24
Pentadecanoate	3.20
Palmitate or hexadecanoate	3.12
Heptadecanoate	3.07
Stearate or octadecanoate	3.02
Nonadecanoate	2.98

**Figura 2.** Constantes dieléctricas de algunos FAMES.

Dielectric constants	40° C
Benzene	2.24
Dibutyl ether	2.94
Toluene	2.40
Hexane	2.02

**Figura 3.** Constantes dieléctricas de disolventes.

De estos disolventes se eligió el hexano ya que es menos perjudicial para la salud que el benceno y tolueno, más asequible que el dibutil éter y además presenta mejores valores de eficiencia atómica [19]. Teniendo en cuenta la bibliografía consultada, se eligió como procedimiento de derivatización una modificación del método propuesto por *Morrison y Smith* [69], utilizado en otras ocasiones por el grupo de investigación y que se basa en una hidrólisis básica con KOH (MeOH), seguida de una derivatización por metilación con BF<sub>3</sub> (MeOH). En cuanto al proceso de extracción, se decidió utilizar hexano como disolvente, para posteriormente analizar los extractos por GC-MS.

### **3. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN**

### **3. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN**

#### **3.1. Reactivos y disolventes:**

- Helio calidad BIP. Carburos metálicos (Barcelona, España).
- Diclorometano, calidad HPLC. LabScan LTD (Dublín, Irlanda).
- n-Hexano, calidad Pestican. LabScan LTD (Dublín, Irlanda).
- Hidróxido de potasio 0.999N en metanol. Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Trifluoruro de boro 14% en metanol. Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Agua ultrapura obtenida con el sistema MilliQ de Millipore (Massachusetts, USA).

#### **3.2. Patrones comerciales:**

- Mezcla de patrones "Supelco 37 Comp. FAME mix " de 10000 mg/L disuelta en diclorometano". Supelco (Pensilvania, USA) → Constituida por una mezcla de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos en diferentes proporciones, según muestra su ficha técnica:

**Tabla 3.** Proporción de ésteres metílicos presentes en la mezcla comercial S37 de Supelco.

<b>S37 10000 mg/L</b>	<b>% peso en la mezcla</b>	<b>mg/L en la mezcla</b>
<b>C4:0</b>	4	400
<b>C6:0</b>	4	400
<b>C8:0</b>	4	400
<b>C10:0</b>	4	400
<b>C11:0</b>	2	200
<b>C12:0</b>	4	400
<b>C13:0</b>	2	200
<b>C14:0</b>	4	400
<b>C14:1(n5)</b>	2	200
<b>C15:0</b>	2	200
<b>C15:1(n5)</b>	2	200
<b>C16:0</b>	6	600
<b>C16:1(n7)</b>	2	200
<b>C17:0</b>	2	200
<b>C17:1(n7)</b>	2	200
<b>C18:0</b>	4	400
<b>C18:1(n9;t9)</b>	2	200
<b>C18:1(n9)</b>	4	400
<b>C18:2(n6;t6)</b>	2	200
<b>C18:2(n6)</b>	2	200

Tabla 3. Continuación.

S37 10000 mg/L	% peso en la mezcla	mg/L en la mezcla
<b>C18:3(n6)</b>	2	200
<b>C18:3(n3)</b>	2	200
<b>C20:0</b>	4	400
<b>C20:1(n9)</b>	2	200
<b>C21:0</b>	2	200
<b>C20:2(n6)</b>	2	200
<b>C20:3(n6)</b>	2	200
<b>C20:4(n6)</b>	2	200
<b>C20:3(n3)</b>	2	200
<b>C22:0</b>	4	400
<b>C22:1(n9)</b>	2	200
<b>C20:5(n3)</b>	2	200
<b>C23:0</b>	2	200
<b>C22:2(n6)</b>	2	200
<b>C24:0</b>	4	400
<b>C24:1(n9)</b>	2	200
<b>C22:6(n3)</b>	2	200

- Patrones individuales puros de los siguientes ésteres metílicos: C14:0, C16:0, C18:0, C22:0, C18:1 (n7), C18:1 (n9), C18:1 (n9;t9), C18:2 (n6), C18:2 (n6;t6). Supelco (Pensilvania, USA).
- Patrón individual del éster metílico del ácido azelaico (ácido nonanodioico). Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).

### 3.3. Instrumentación:

#### 3.3.1. Equipo cromatográfico:

El equipo utilizado es un cromatógrafo de gases modelo 6890A de Agilent Technologies (Palo Alto, California, USA) que consta de:

- Inyector automático 7683B con bandeja muestreadora de 100 viales.
- Horno.
- Columna capilar recomendada para el análisis de FAMES: BPX70, 70% cianopropil 30% polisilfenileno, dimensiones 60m x 250 µm x 0.25 µm. SGE® Phenomenex (New South Wales, Australia).
- Detector espectrómetro de masas modelo 5975 C de Agilent Technologies.

- Software *MSD ChemStation 5973* de Agilent Technologies como sistema de control, adquisición y tratamiento de datos.

### **3.3.2. Material de laboratorio y otros equipos empleados:**

- Balanza analítica de precisión. Modelo AE-20 (Mettler, Zurich, Suiza).
- Centrífuga termostataada. Modelo 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- Agitador Vortex. Modelo Reax Control (Heidolph, Schwabach, Alemania)
- Estufa (Heraeus, Hanau, Alemania).
- Baño de ultrasonidos (J. P. Selecta, Barcelona, España).
- Horno.
- Micropipetas.
- Tubos eppendorf de plástico.
- Mortero.
- Jeringas de plástico.
- Viales.
- Insertos de vidrio para viales.
- Espátula.
- Parafilm.
- Material de vidrio de laboratorio de uso general: matraces y vasos de precipitados.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1. Compuestos estudiados:**

El método que se describe en esta memoria tiene como finalidad el análisis de ácidos grasos en muestras de contexto arqueológico mediante GC-MS; para ello es necesario llevar a cabo una hidrólisis de los acilglicéridos presentes en la matriz que nos proporcione ácidos grasos libres, derivatizarlos para hacerlos más volátiles y facilitar su determinación por GC, y finalmente extraerlos de la muestra con un disolvente orgánico para así llevar a cabo su inyección en el cromatógrafo. En cualquier caso, es necesario para poder identificar correctamente los ácidos grasos derivatizados utilizar patrones que se encuentren derivatizados también. Debido a que se desconoce a priori qué ácidos grasos van a estar presentes en la muestra, y por lo tanto no es posible establecer el perfil de ácidos grasos, se decidió estudiar el mayor número posible de ácidos grasos (saturados, mono-insaturados y poli-insaturados); para ello se seleccionó un patrón comercial, que como hemos visto en el anterior apartado, contiene una mezcla de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos tanto saturados como insaturados de 4 a 24 átomos de carbono (aunque el C4:0 por eluir demasiado pronto y porque no se ha utilizado como biomarcador en la bibliografía, no ha sido estudiado) Se estudiaron dos compuestos más, el éster metílico del ácido azelaico (producto de oxidación del ácido oleico, linoleico y/o linolénico, típico en muestras vegetales en contexto arqueológico) y el éster metílico del isómero del ácido oleico con el doble enlace *cis* en la posición 7, C18:1 (n7), por considerarlo fundamental para discernir el origen de grasa de animal rumiante y no rumiante.

En la Tabla 4 aparecen especificados los nombres de todos los FAMES estudiados. Se van a nombrar de acuerdo a la siguiente nomenclatura: **Cx:y(nz;ta)**. Donde "x" es el número de átomos de carbono del ácido graso, "y" el número de insaturaciones del mismo, "z" la posición del primer doble enlace empezando a contar por el extremo metilo terminal (como en la nomenclatura omega) y "a" la posición convencional de un doble enlace *trans*, que en el caso de no indicar nada en esta posición, el doble enlace es *cis*.

**Tabla 4.** Lista de los FAME estudiados en las muestras por orden creciente de nº de carbonos e insaturaciones.

<b>FAME</b>	<b>Nombre común</b>	Numeración en los cromatogramas
C4:0	metil butirato	No sale en la mezcla S37
C6:0	metil hexanoato	1
C8:0	metil octanoato	2
C10:0	metil decanoato	3
C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	mono-metil azelato	37
C11:0	metil undecanoato	4
C12:0	metil laureato	5

Tabla 4. Continuación.

FAME	Nombre común	Numeración en los cromatogramas
C13:0	metil tridecanoato	6
C14:0	metil tetradecanoato	7
C14:1(n5)	metil miristoleato	8
C15:0	<i>cis</i> -9 metil pentadecanoato	9
C15:1(n5)	<i>cis</i> -10 metil pentadecenoato	10
C16:0	metil palmitato	11
C16:1(n7)	metil palmitoleato	12
C17:0	metil heptadecanoato	13
C17:1(n7)	<i>cis</i> -10 metil heptadecenoato	14
C18:0	metil octadecanoato	15
C18:1(n9)	<i>cis</i> -9 metil oleato	17
C18:1(n9;t9)	<i>trans</i> -9 metil elaidato	16
C18:1(n7)	<i>cis</i> -11 metiloleato	38
C18:2(n6)	metil linoleato	19
C18:2(n6;t6)	metil linolelaidato	18
C18:3(n3)	metil $\alpha$ -linolenato	21
C18:3(n6)	metil $\gamma$ -linolenato	20
C20:0	metil araquidato	22
C20:1(n9)	metil eicosenoato	23
C20:2(n6)	<i>cis</i> -11,14 metil eicosadienoato	25
C20:3(n3)	<i>cis</i> -11,14,17 metil eicosatrienoato	28
C20:3(n6)	<i>cis</i> -8,11,14 metil eicosatrienoato	26
C20:4(n6)	<i>cis</i> -5,8,11,14 metil eicosatetraenoato	27
C20:5(n3)	<i>cis</i> -5,8,11,14,17 metil eicosapentaenoato	31
C21:0	metil heneicosanoato	24
C22:0	metil docosanoato	29
C22:1(n9)	metil erucato	30
C22:2(n6)	<i>cis</i> -13,16 metil docosadienoato	33
C22:6(n3)	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19 metil docosahexaenoato	36
C23:0	metil tricosanoato	32
C24:0	metil lignocerato	34
C24:1(n9)	metil nervonato	35

#### 4.2. Preparación de las disoluciones patrón:

La mezcla comercial S37 que contenía los ésteres metílicos de los ácidos grasos mostrados en la Tabla 4, estaba disuelta en diclorometano con una concentración de 10000 mg/L (ppm)

de mezcla. Teniendo en cuenta la bibliografía consultada, se sabía que uno de los mejores disolventes para este tipo de analitos era el hexano (no el diclorometano) por tener una constante dieléctrica similar a los mismos [19], de hecho fue el extractante elegido en el método analítico; además, el hexano tiene un punto de ebullición menor que el diclorometano por lo que se espera que tarde más en evaporarse. No debe obviarse, por otra parte, que el diclorometano es un disolvente organoclorado más perjudicial para el medioambiente que el hexano; por ello, y puesto que el hexano y el diclorometano son miscibles, se prepararon dos líneas de calibrado por diluciones del patrón de 10000 ppm (disuelto en diclorometano) según el intervalo de linealidad: por un lado llevando a cabo las diluciones sucesivas con diclorometano y por otro lado con hexano. Los resultados que se obtuvieron, como se indica en el apartado 5.3, fueron similares e incluso algo mejores para ciertos analitos cuando las diluciones se hicieron con hexano. Por ello, fue el disolvente elegido para hacer las diluciones durante el resto de la experimentación para la mezcla S37; se preparó, por dilución 1:100 de la original, una disolución de 100 ppm y desde ésta, por dilución 1:10, una de 10 ppm que se almacenaron en el congelador. A partir de ellas se obtuvieron, mediante las diluciones correspondientes, el resto de las disoluciones a las concentraciones necesarias que también se almacenaron en el congelador para evitar, en la mayor medida posible, la evaporación del disolvente.

Con respecto a los patrones individuales de los ésteres metílicos del C14:0, C16:0, C18:0, C22:0, C18:1(n9), C18:1(n7), C18:1(n9;t9), C18:2(n6) y C18:2(n6;t6), se prepararon por pesada desde el sólido puro individual y se disolvieron, por las razones ya indicadas, en hexano. Se prepararon inicialmente disoluciones de concentración 1000 mg/L (ppm) y desde ahí, por dilución con hexano, se obtuvieron el resto.; se almacenaron en el congelador hasta su uso. Los patrones de C14:0, C16:0, C18:0 y C22:0 se prepararon para corroborar que el área proporcionada por una determinada concentración de patrón puro era similar a la originada por la misma concentración en la mezcla S37. Por su parte, los patrones individuales de C18:1 (n9), C18:1(n9;t9), C18:2(n6) y C18:2(n6;t6) se utilizaron para corroborar el tiempo de retención del isómero correspondiente de la mezcla S37 con la columna empleada. Por último, el C18:1 (n7) también se preparó de manera individual por las razones anteriormente comentadas.

En relación al éster metílico del ácido azelaico, se trataba de un líquido muy viscoso, de color blanquecino que resultó ser insoluble en hexano. Se disolvió perfectamente en diclorometano, por lo que éste fue el disolvente elegido para preparar una disolución por pesada de 500 mg/L (ppm), que se utilizó para preparar otra de 5 ppm y a partir de ésta, el resto de disoluciones. Todas ellas se almacenaron en el congelador. No obstante, al efectuar los ensayos de precisión intermedia (apartado 5.5), se obtuvieron coeficientes de variación muy elevados con respecto a los obtenidos con la mezcla S37 donde el disolvente era el hexano; como se comentó anteriormente el patrón puro era insoluble en hexano, pero pruebas posteriores demostraron que si que era posible utilizar el hexano para realizar las diluciones a partir de la de 500 ppm en diclorometano, aprovechando que el hexano y el diclorometano son miscibles.

Se observó que para las mismas concentraciones obtenidas por dilución, las áreas obtenidas eran bastante similares en ambos disolventes, mientras que los coeficientes de variación mejoraban muy notablemente cuando se utilizaba hexano como disolvente. Por estos motivos, se seleccionó entonces el hexano como disolvente para preparar las diluciones necesarias para el estudio de la precisión intermedia, para el resto de casos se continuó utilizando el diclorometano.

### 4.3. Determinación cromatográfica:

Se partió inicialmente de las condiciones cromatográficas utilizadas previamente por el Grupo de Investigación TESEA para el análisis de ácidos grasos en contexto arqueológico:

- **Condiciones cromatográficas iniciales:**

1. Columna: Phenomenex SP-2560 (100% cianopropilsiloxano, 100m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.20  $\mu\text{m}$ ).
2. Volumen inyección: 1  $\mu\text{L}$ .
3. Gas portador: He, 1.1 mL/min.
4. Inyección en modo *pulsed splitless* (sin división de flujo, con pulso de presión).
5. Temperatura del inyector: 250°C.
6. Temperatura de la interfase: 310°C.
7. Temperatura de la fuente de iones (*MS Source*): 230°C.
8. Temperatura del cuadrupolo (*MS Quad*): 150°C.
9. Tiempo total de análisis: **58.33** minutos.

**Tabla 5.** Programa de temperatura utilizado en el método original.

	Pendiente (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Inicialmente		50	1
Rampa1	6	205	17
Rampa 2	10	250	10

Con la intención de mejorar el método, esta columna se sustituyó por otra de menor longitud pero de mayor espesor de la fase estacionaria, esperándose una disminución del tiempo de análisis. Se empleó una BPX70 (70% cianopropil 30% polisilfenileno, 60m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ ), con la cual era recomendable emplear una temperatura máxima de 230°C si se operaba durante un tiempo prolongado en gradiente como era nuestro caso.

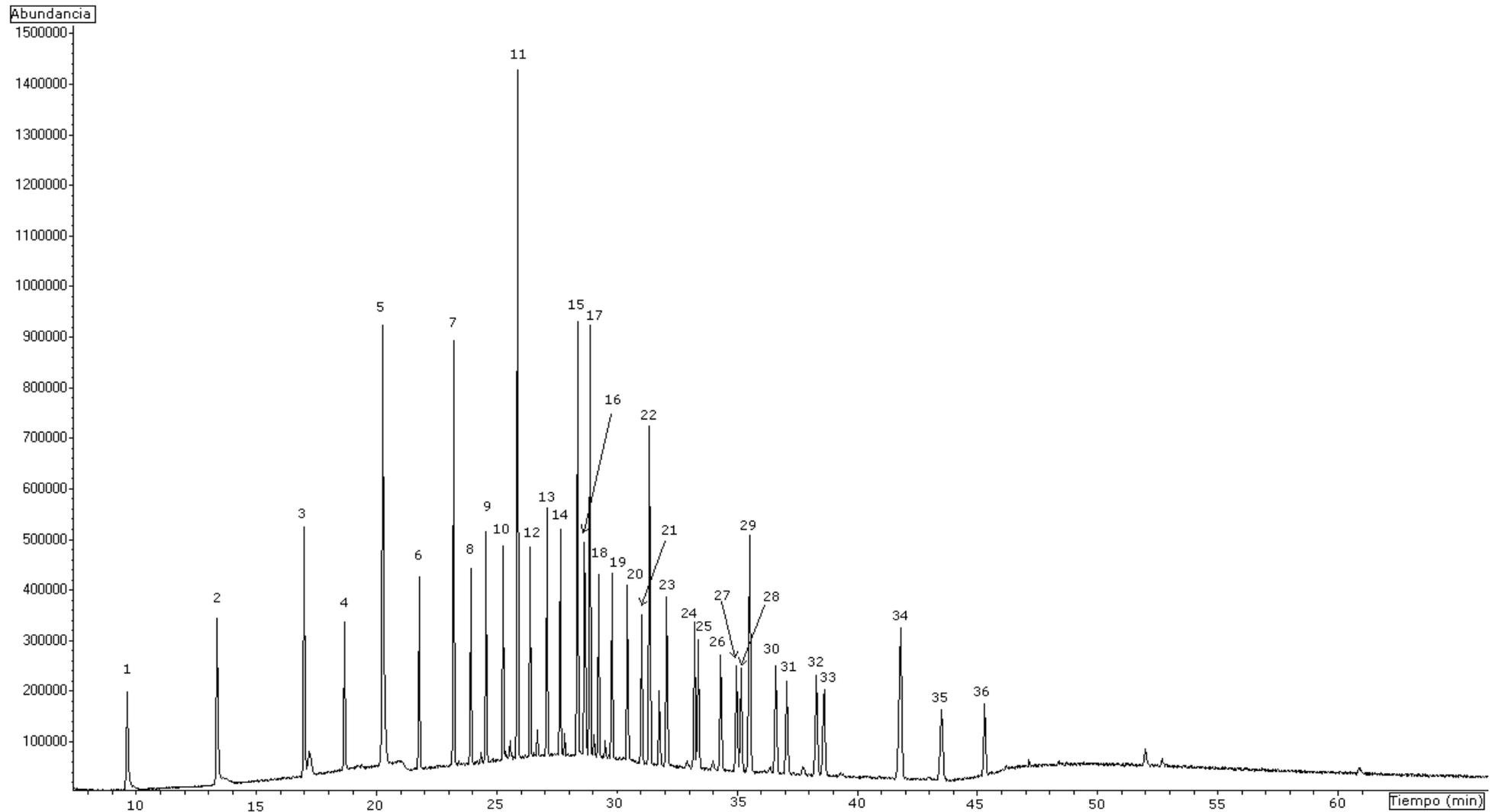
Inicialmente se utilizó la misma rampa de temperatura antes indicada (Tabla 5) pero modificando la temperatura final, bajándola a 230°C, y alargando el último paso a 20 minutos para compensar la disminución de temperatura final. Con este programa el tiempo de análisis era de **66.33 minutos**, y se consiguió la separación de todos los FAMEs (Figura 4), pero el tiempo del cromatograma era demasiado largo. Con la intención de acortar el tiempo de análisis, se probaron diferentes programas de temperaturas. Con las condiciones finales (Tabla 6), se consiguió la separación de todos los analitos en **35.33 minutos** (Figura 5), por lo que se logró reducir casi a la mitad el tiempo de análisis. Las condiciones finales del método cromatográfico se detallan a continuación:

• **Condiciones cromatográficas finales:**

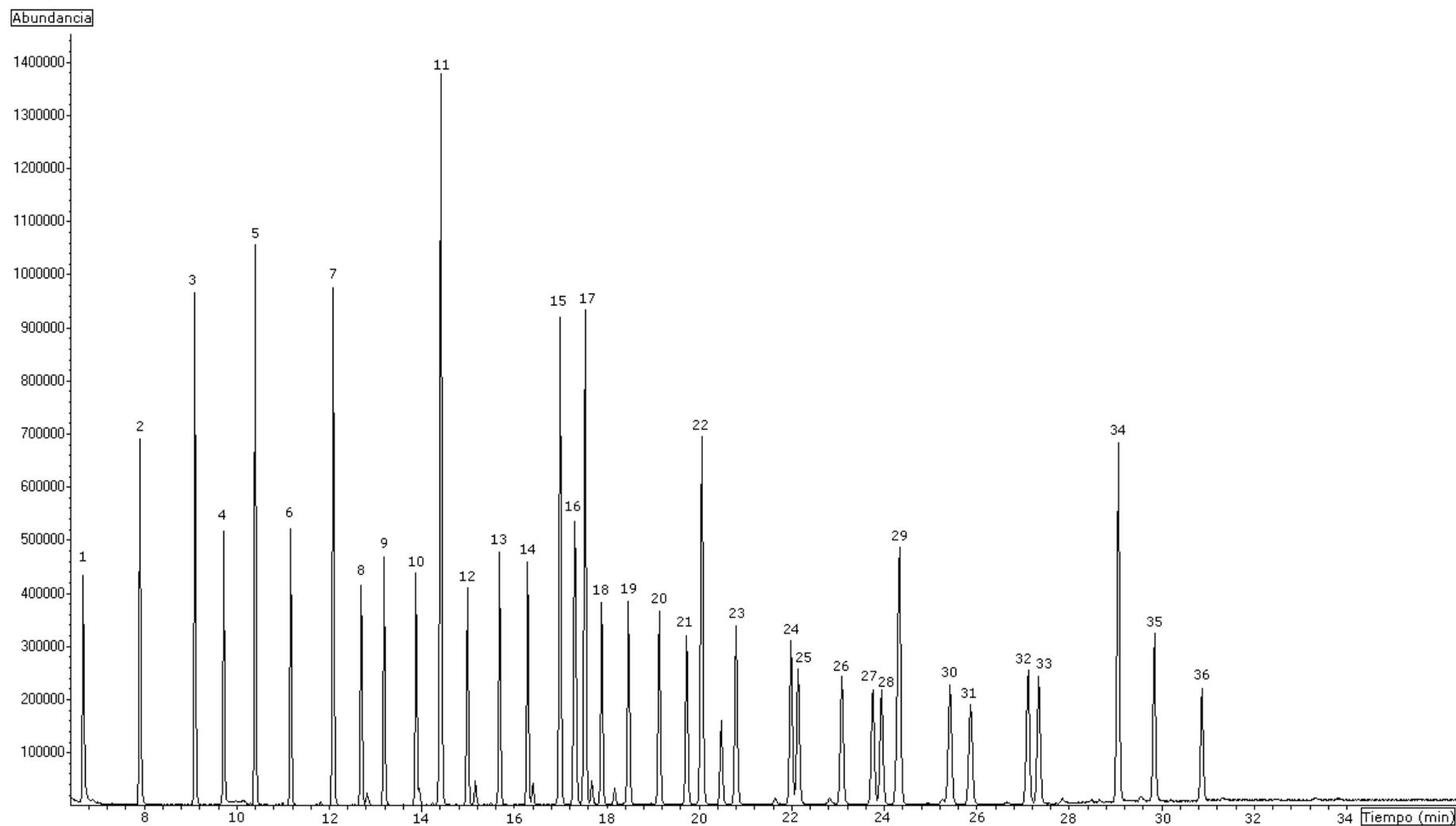
1. Columna: BPX70 (70%Cianopropil 30%polisilfenileno) de dimensiones 60m x 250 µm x 0.25 µm.
2. Volumen inyección: 1µL
3. Gas portador: He, 1.1mL/min.
4. Inyección en modo Pulsed Splitless (sin división de flujo, con pulso de presión).
5. Temperatura del inyector: 250°C.
6. Temperatura de la interfase: 310°C.
7. Temperatura de la fuente de iones (MS Source): 230°C.
8. Temperatura del cuadrupolo (MS Quad): 150°C.
9. Tiempo total de análisis: **35.33 minutos**.

**Tabla 6.** Programa de temperatura utilizado en el método propuesto.

	<b>Pendiente (°C/min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Inicialmente		50	1
Rampa1	20	180	5
Rampa 2	6	205	10
Rampa 3	15	230	7



**Figura 4.** Cromatograma mezcla patrón S37 con las condiciones cromatográficas iniciales con la columna BPX70 en modo SCAN (GC-MS). La numeración de los FAMES se corresponde con la recogida en la Tabla 4.



**Figura 5.** Cromatograma mezcla patrón S37 con las condiciones cromatográficas finales con la columna BPX70 en modo SCAN (GC-MS). La numeración de los FAMES se corresponde con la recogida en la Tabla 4.

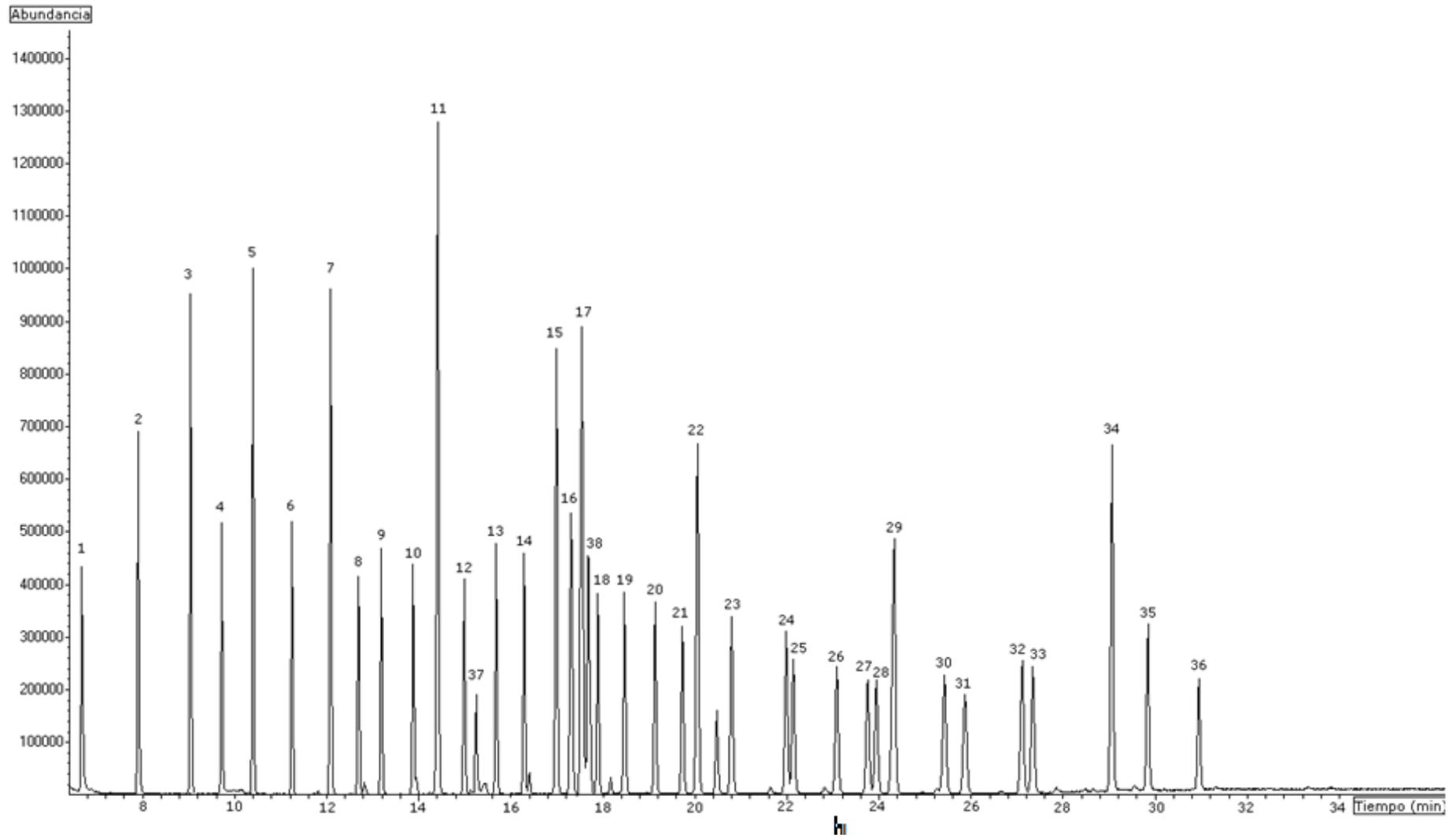
#### 4.4. Identificación de los compuestos estudiados:

El trabajar en modo SIM (*selected ion monitoring*) supone obtener cromatogramas más limpios y ganar resolución. Para ello, fue necesario crear una "ventana de tiempos" para que el detector sólo buscara en cada momento los iones de cuantificación y de confirmación de un determinado analito entorno a su tiempo de retención (Tr). Estos iones de cuantificación (T) y de confirmación (Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub>) fueron elegidos previamente para cada FAME por el grupo de investigación TESEA en investigaciones anteriores, y confirmados por las librerías de espectros. Para facilitar la identificación de cada uno de ellos, se crearon grupos dependiendo del tiempo de retención, y seleccionando los iones que el detector va a analizar en cada caso (Tabla 7). De este modo, cada compuesto se identificará en las muestras y/o patrones según el tiempo de retención, los iones de cuantificación y de confirmación así como por las abundancias relativas de cada ión (100% para el de cuantificación, T) para un analito dado.

**Tabla 7.** Ventana de tiempos modo SIM del método cromatográfico elegido.

FAME	Tr (min)	Grupo	Inicio	Ión T	Ión Q <sub>1</sub>	Ión Q <sub>2</sub>
C6:0	6,58	1	6.00	74	87	99
C8:0	7,83	2	7.40	74	87	127
C10:0	9,05	3	8.60	74	143	155
C11:0	9,75	3		74	157	169
C12:0	10,43	3		74	171	183
C13:0	11,21	4	10.70	74	185	228
C14:0	12,22	5	11.60	74	199	242
C14:1(n5)	12,72	5		55	166	208
C15:0	13,24	5		74	213	256
C15:1(n5)	13,19	6	13.50	55	222	254
C16:0	14,46	6		74	227	270
C16:1(n7)	15,02	6		55	236	268
Ácido azelaico	15,29	6		152	185	143
C17:0	15,76	7	15.46	74	241	284
C17:1(n7)	16,34	7		55	250	282
C18:0	17,07	8	16.50	74	255	298
C18:1(n9;t9)	17,36	8		55	264	296
C18:1(n9)	17,58	8		55	264	296
C18:1(n7)	17,74	8		55	264	296
C18:2(n6;t6)	17,95	8		67	263	294
C18:2(n6)	18,52	8		67	263	294
C18:3(n6)	19,17	9	18.85	79	194	292
C18:3(n3)	19,77	9		79	194	292
C20:0	20,19	9		74	283	326
C20:1(n9)	20,91	10	20.40	55	292	324
C21:0	22,18	11	21.40	74	297	340
C20:2(n6)	22,24	11		81	291	322
C20:3(n6)	23,17	12	22.55	79	222	320
C20:4(n6)	23,82	13	23.45	79	150	325
C20:3(n3)	24,03	13		79	289	320
C22:0	24,58	14	24.25	74	311	354
C22:1(n9)	25,66	15	25.10	55	320	352
C20:5(n3)	25,93	15		79	91	201
C23:0	27,40	16	26.40	74	325	368
C22:2(n6)	27,49	16		67	319	350
C24:0	29,30	17	28.50	74	339	382
C24:1(n9)	30,05	18	29.60	55	348	380
C22:6(n3)	30,933	19	30.30	79	241	313

Todo el resto del trabajo se desarrolló con las condiciones cromatográficas finales antes indicadas y con el detector en modo SIM según con los datos recogidos en la Tabla 7. Con estas condiciones se obtuvieron cromatogramas como el que se muestra en la Figura 6. En él se observa como todos los FAMES de la mezcla S37 (con la excepción del C4:0), el C18:1 (n7) y el ácido azelaico están perfectamente separados entre sí de manera aproximadamente constante y definidos hasta línea de base, excepto los isómeros del ácido oleico C18:1(n9) y C18:1(n7) que están algo más juntos y por ello no se separan completamente hasta línea de base, pero que pueden cuantificarse (la numeración seguida en el cromatograma es la de la Tabla 4).



**Figura 6.** Cromatograma de todos los compuestos estudiados con las condiciones cromatográficas finales en modo SIM (GC-MS). La numeración seguida en el cromatograma es la de la Tabla 4.

#### 4.5. Optimización del tratamiento de muestra:

Inicialmente, se utilizó el tratamiento de muestra empleado en anteriores ocasiones por el grupo de investigación TESEA para el análisis de ácidos grasos en contexto arqueológico, el cual era una modificación del método de *Morrison-Smith* [69] y que consistía en las siguientes etapas:

- Pesar 5 mg de muestra en un tubo eppendorf de 2 mL.
- Añadir en el tubo 100  $\mu$ L de KOH (MeOH) 1N.
- Agitar 30 segundos en vortex.
- Calentar en el horno 5 minutos a 100°C (para que se produzca la hidrólisis).
- Dejar enfriar hasta temperatura ambiente.
- Añadir inmediatamente en el mismo tubo 100  $\mu$ L BF<sub>3</sub> (MeOH) al 14%.
- Agitar 30 segundos en vortex.
- Calentar en el horno 5 minutos a 100°C (para que se produzca la metilación).
- Dejar enfriar de nuevo hasta temperatura ambiente.
- Añadir 500  $\mu$ L de hexano (extracción) y 600  $\mu$ L de agua desionizada (para el lavado de la fase orgánica).
- Agitar otros 30 segundos en el vortex.
- Centrifugar 5 minutos a 20°C y 2790 rpm (para dejar el sólido en el fondo).
- Separar la fase orgánica (es la que contiene a los FAMES) y llevarla a un vial cromatográfico para su análisis por GC-MS.

Al aplicar el método desde la etapa de extracción a las muestras adicionadas con patrón (se había dejado que se evaporase el disolvente), se observó un aumento de la concentración de los compuestos con respecto a la del patrón en disolución que se adicionó a las mismas. Ha de señalarse que en ambos casos no han sido realizadas las etapas de hidrólisis ni de metilación, ya que los patrones ya estaban metilados. Cuando se calcularon los porcentajes de recuperación de las muestras a las se las adicionaba 10  $\mu$ L del patrón y luego se las aplicaba la extracción (como se explicará en el apartado 4.6), éstos valores eran bastante más elevados del 100%, llegando en el caso de la adición de concentraciones bajas (entre el límite de cuantificación (LOQ) y 3xLOQ) hasta el 200%. Al adicionar el mismo volumen de patrón a la fase orgánica de otras alícuotas de la mismas muestras a las que no se las había adicionado patrón y que habían sido sometida al proceso de extracción para comprobar la existencia de efecto matriz (como se explicará en el apartado 4.6), se descubrió que efectivamente una parte de ese elevado porcentaje de recuperación se debía al efecto matriz, pero aún así había otro factor que estaba afectando a la extracción de los analitos. La evaporación del disolvente (hexano) no podía estar produciéndose en el vial, ya que no sólo se almacenaba en el congelador antes y después de la inyección, sino que los coeficientes de variación obtenidos después de inyectar un mismo patrón en diferentes días eran bastante buenos (precisión intermedia, ver el apartado 5.5); de este modo, el problema debía estar

relacionado con alguna etapa del tratamiento de muestra donde se pudiera producir la evaporación del disolvente, y se pensó en la etapa de centrifugación.

Se estudió en primer lugar la temperatura de centrifugación, y en lugar de realizarse a 20°C se centrifugó a 10°C (a 2790 rpm en ambos casos); sin embargo los resultados eran prácticamente idénticos. Posteriormente se evaluó la influencia de la velocidad de centrifugación (rpm), pensando que el giro dentro del tambor de la centrífuga provocaba un aumento de la temperatura que hacía que los eppendorf no estuviesen realmente a la temperatura fijada sino a una temperatura mayor. Se probó entonces a centrifugar alícuotas de un mismo patrón mezcla S37 de concentración intermedia dentro de los valores de la línea de calibrado (10ppm de mezcla) a diferentes combinaciones de temperatura y velocidad de centrifugado: 20°C y 2790 rpm, 20°C y 1350 rpm, 10°C y 2790 rpm y 10°C y 1350 rpm. Todas estas pruebas se llevaron a cabo el mismo día. En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para un FAME representativo de cada grupo (cadena corta, cadena media, cadena larga e insaturado).

**Tabla 8.** % de evaporación del patrón centrifugado con respecto al mismo patrón sin centrifugar a diferentes temperaturas y rpm.

<b>FAME 10°C</b>	Área patrón sin centrifugar	Área centrifugado a 1350 rpm	Área centrifugado a 2790 rpm	<b>% evaporación a 1350 rpm</b>	<b>% evaporación a 2790 rpm</b>
C8:0	248455	260637	269699,5	4,9	8,6
C16:0	353958	378151	395079,5	6,8	11,6
C18:0	211920	227421	240083	7,3	13,3
C14:1(n5)	42941	47958,5	50513,5	11,7	17,6
<b>FAME 20°C</b>	Área patrón sin centrifugar	Área centrifugado a 1350 rpm	Área centrifugado a 2790 rpm	<b>% evaporación a 1350 rpm</b>	<b>% evaporación a 2790 rpm</b>
C8:0	248455	266396,5	269484,5	7,2	8,5
C16:0	353958	401050,5	396412,5	13,3	12,0
C18:0	211920	239984	239877,5	13,2	13,2
C14:1(n5)	42941	48073,5	50633	12,0	17,9

Se observó que centrifugar a 2790 rpm a las dos temperaturas ensayadas da resultados prácticamente iguales; mientras que centrifugando a 1350 rpm, la evaporación es casi el doble a 20°C que a 10°C con la excepción del FAME insaturado en la que apenas se nota variación. También puede observarse como a 10°C, la evaporación prácticamente se duplica cuando se centrifuga a 2790 rpm; el factor crítico estaba siendo la velocidad de centrifugación. Por lo tanto se eligen como mejores condiciones de centrifugación 10°C y 1350 rpm. Se hicieron pruebas a velocidades más bajas, pero no se observaban con claridad las dos fases.

#### 4.6. Eficacia de la extracción con hexano y elección del método final:

Para comprobar si la extracción con hexano es adecuada se realizaron dos pruebas distintas: **i)** se adicionó a una porción de una de las muestras (5 mg), en este caso procedente de una vasija enterrada en una tumba Vaccea, 10  $\mu$ L de patrón antes del tratamiento de muestra desde la etapa de extracción; **ii)** a otra porción de la misma muestra (5 mg) se le añadió la alícuota de patrón en la misma concentración después de realizar el tratamiento de muestra desde la etapa de extracción.

En el primer caso, se pesaron los 5 mg de muestra, se adicionaron los 10  $\mu$ L de patrón, se dejó evaporar el disolvente, y se efectuó el tratamiento de muestra anteriormente descrito a partir de la etapa de extracción. Al analizar este extracto, se van a tener en cuenta los efectos debidos al proceso de extracción y al posible efecto matriz asociado al detector de espectrometría de masas y que puede afectar a la ionización de los analitos. En el segundo caso, se pesaron los 5 mg de muestra, se efectuó el tratamiento de muestra desde la etapa de extracción, y se adicionaron los 10  $\mu$ L de patrón a la fase orgánica que queda en la parte superior del eppendorf (en este caso se adicionaron 10  $\mu$ L menos de hexano), se agitó brevemente en el vortex a la espera de que se volviesen a visualizar claramente las dos fases, se recogió la fase orgánica y se inyectó en el GC-MS. Con esta segunda prueba se estudió sólo el efecto matriz que modifica la ionización. Además, se preparó un "blanco" en cada caso por si hubiese señal de alguno de los compuestos inherente a la muestra. Se pesaron los 5 mg de la muestra, se llevó a cabo el tratamiento de muestra sin efectuar las etapas de hidrólisis y metilación para que estuvieran en las mismas condiciones, y la fase orgánica se analizó por GC-MS.

Así, comparando la señal obtenida para cada FAME después de analizar las muestras a las que se adicionó el patrón antes y después del tratamiento de muestra, se podrá calcular la eficacia de la extracción (% de recuperación), ya que el efecto matriz queda anulado al comparar resultados entre muestras. Mientras que si se compara la señal de cada FAME obtenida al adicionar el patrón después de realizar el tratamiento de muestra con la señal obtenido por ese FAME en la misma concentración pero en disolución (sin muestra), se obtendría la influencia de la matriz en la ionización.

Se adicionaron patrones tanto de la mezcla S37, como del éster metílico del ácido azelaico y el del C18:1(n7), a tres niveles de concentración: **i)** nivel inferior que estará comprendido entre el LOQ y 3 veces el LOQ para cada uno de los 38 compuestos estudiados; **ii)** nivel intermedio de la línea de calibrado; **iii)** nivel superior de la línea de calibrado. En los tres casos se adicionó una concentración 50 veces superior a la deseada para compensar la dilución 1:50 que sufre el patrón (10  $\mu$ L de patrón se llevan a un volumen final de 500  $\mu$ L de hexano de fase orgánica). Para poder adicionar el nivel inferior de la mezcla S37 hubo que diseñar grupos de FAME cuyo % de recuperación pudiese estudiarse con la misma

concentración añadida para no tener que hacer el estudio con 36 muestras distintas (Tabla 9); mientras que el punto intermedio y superior fue común a todos los compuestos.

**Tabla 9.** Concentraciones elegidas de mezcla, en mg /L (ppm), para la adición del nivel inferior del patrón S37 a la muestra.

<b>FAME</b>	<b>ppm mezcla S37 elegida</b>	<b>ppm mezcla S37 finales en la muestra</b>	<b>ppm finales de cada FAME en la muestra</b>
C6:0	0,5	0,01	0,0004
C8:0	0,5	0,01	0,0004
C10:0	0,5	0,01	0,0004
C11:0	2,5	0,05	0,0010
C12:0	2,5	0,05	0,0020
C13:0	5,0	0,10	0,0020
C14:0	5,0	0,10	0,0040
C14:1(n5)	25,0	0,50	0,0100
C15:0	25,0	0,50	0,0100
C15:1(n5)	25,0	0,50	0,0100
C16:0	0,5	0,01	0,0006
C16:1(n7)	25,0	0,50	0,0100
C17:0	5,0	0,10	0,0020
C17:1(n7)	25,0	0,50	0,0100
C18:0	0,5	0,01	0,0004
C18:1(n9;t9)	50,0	1,00	0,0200
C18:1(n9)	25,0	0,50	0,0200
C18:2(n6;t6)	25,0	0,50	0,0100
C18:2(n6)	25,0	0,50	0,0100
C18:3(n6)	50,0	1,00	0,0200
C18:3(n3)	50,0	1,00	0,0200
C20:0	5,0	0,10	0,0040
C20:1(n9)	25,0	0,50	0,0100
C21:0	5,0	0,10	0,0020
C20:2(n6)	50,0	1,00	0,0200
C20:3(n6)	125,0	2,50	0,0500
C20:4(n6)	125,0	2,50	0,0500
C20:3(n3)	125,0	2,50	0,0500
C22:0	5,0	0,10	0,0040
C22:1(n9)	125,0	2,50	0,0500
C20:5(n3)	125,0	2,50	0,0500
C23:0	25,0	0,50	0,0100
C22:2(n6)	50,0	1,00	0,0200
C24:0	25,0	0,50	0,0200
C24:1(n9)	125,0	2,50	0,0500
C22:6(n3)	25,0	0,50	0,0100

Con respecto al ácido azelaico, se tomó como concentración inferior 2,5 ppm (que equivalen a 0,05 ppm en la muestra) y para el C18:1(n7) la de 2 ppm (que son 0,04 ppm en la muestra). Ambas concentraciones se encuentran comprendidas dentro del intervalo LOQ y 3x LOQ.

En relación a la preparación de la concentración intermedia, para la mezcla S37 se tomaron 10 µL de una disolución de 500 ppm mezcla (que equivalen a 10ppm finales en la muestra, y donde la concentración final de cada FAME viene determinada según el porcentaje en el que se encuentre en la mezcla, Tabla 3), para el ácido azelaico se utilizó una disolución de 25 ppm (0,5 ppm finales) y para el C18:1(n7) una de 10 ppm (0,2 ppm finales). Finalmente, para preparar la concentración superior, se utilizó una concentración de 2000 ppm de la mezcla S37 (40ppm finales de mezcla total y donde cada FAME está en una concentración según el porcentaje recogido en la Tabla 3), para el ácido azelaico una de 250 ppm (5ppm finales) y para el C18:1(n7) una de 40 ppm (0,8 ppm finales). A continuación se muestran las tablas (Tablas 10, 11 y 12) donde se muestran los porcentajes de recuperación, calculados para muestras a las que se les adicionaron las cantidades anteriormente mencionadas de patrón antes y después de realizar el tratamiento de muestra. El porcentaje se calcula de la siguiente manera: (área de FAME en la muestra adicionada/área de FAME en la disolución patrón)\*100. Al comparar ambos valores, se calcula la eficacia de la extracción a los tres niveles de concentración.

**Tabla 10.** Eficacia de la extracción (% recuperación) obtenida para el nivel de concentración inferior.

<b>FAME</b>	<b>% recuperación adicionando antes de la extracción</b>	<b>% recuperación adicionando después de la extracción</b>	<b>Eficacia de la extracción</b>
C6:0	70,2	118,4	51,8
C8:0	124,8	130,5	94,2
C10:0	93,0	107,0	86,1
C11:0	110,4	111,6	98,8
C12:0	123,6	150,8	72,8
C13:0	139,0	149,9	89,2
C14:0	127,7	157,1	70,6
C14:1(n5)	151,9	166,3	85,7
C15:0	137,1	164,1	73,1
C15:1(n5)	133,0	140,8	92,2
C16:0	142,9	169,3	73,7
C16:1(n7)	164,5	171,0	93,4
C17:0	153,1	167,0	86,1
C17:1(n7)	131,8	154,6	77,2
C18:0	149,4	179,4	70,0
C18:1(n9;t9)	161,6	191,2	70,4
C18:1(n9)	145,4	149,9	95,5
C18:1(n7)	142,2	155,5	86,6
C18:2(n6;t6)	142,0	159,3	82,7
C18:2(n6)	131,8	141,3	90,5
C18:3(n6)	126,0	138,0	88,0
C18:3(n3)	130,9	144,4	93,5
C20:0	142,8	145,4	97,3
C20:1(n9)	142,8	156,7	86,0
C21:0	148,2	164,3	83,9
C20:2(n6)	139,3	169,0	70,4
C20:3(n6)	136,8	139,2	97,6
C20:4(n6)	140,0	162,3	77,7

**Tabla 10.** Continuación.

<b>FAME</b>	% recuperación adicionando antes de la extracción	% recuperación adicionando después de la extracción	<b>Eficacia de la extracción</b>
C20:3(n3)	141,3	153,2	88,1
C22:0	132,6	135,7	96,9
C22:1(n9)	137,2	149,5	87,7
C20:5(n3)	127,6	132,0	95,6
C23:0	137,6	152,7	84,9
C22:2(n6)	83,3	100,2	83,1
C24:0	133,8	161,2	72,5
C24:1(n9)	153,0	168,2	84,8
C22:6(n6)	124,9	135,9	89,0
Azelaico	105,0	132,7	72,3

A la vista de los resultados obtenidos, para la adición con niveles bajos de concentración se obtienen porcentajes de recuperación (teniendo en cuenta sólo el efecto de la extracción) que oscilan entre el 70,0 y el 98,8 % para todos los compuestos, la mayoría de ellos por encima del 82%, con la excepción del C6:0 que presenta un porcentaje cercano al 50 %. Es lógico este porcentaje obtenido para el C6:0, ya es el FAME más volátil y por lo tanto se volatiliza a la vez que lo hace el disolvente. En la bibliografía se ha encontrado referencia al hecho de que el uso de disolventes volátiles puede provocar que se evaporen también parte de los FAMEs menos volátiles (C4:0 hasta el C14:0 o incluso el C16:0) [19].

**Tabla 11.** Eficacia de la extracción (% recuperación) para el nivel de concentración intermedio.

<b>FAME</b>	% recuperación adicionando antes de la extracción	% recuperación adicionando después de la extracción	<b>Eficacia de la extracción</b>
C6:0	50,1	100,4	49,7
C8:0	73,7	102,7	70,9
C10:0	90,5	106,6	83,9
C11:0	94,5	110,5	84,0
C12:0	95,6	110,7	84,9
C13:0	99,4	115,0	84,5
C14:0	101,2	116,9	84,3
C14:1(n5)	109,1	121,7	87,4
C15:0	106,0	123,6	82,4
C15:1(n5)	116,8	119,3	97,5
C16:0	102,6	117,2	85,4
C16:1(n7)	115,8	125,7	90,1
C17:0	109,1	126,2	82,9
C17:1(n7)	114,6	124,8	89,8
C18:0	106,5	122,8	83,7
C18:1(n9;t9)	116,8	133,0	83,8
C18:1(n9)	103,4	116,0	87,4
C18:1(n7)	141,9	160,6	81,3
C18:2(n6;t6)	109,7	128,1	81,6
C18:2(n6)	110,3	124,4	85,9
C18:3(n6)	110,3	128,2	82,1
C18:3(n3)	116,4	135,5	81,0
C20:0	108,5	125,4	83,1
C20:1(n9)	122,4	130,7	91,7
C21:0	115,1	132,1	83,0
C20:2(n6)	115,1	130,6	84,5
C20:3(n6)	116,5	132,0	84,5
C20:4(n6)	117,6	147,4	70,2

**Tabla 11.** Continuación.

<b>FAME</b>	% recuperación adicionando antes de la extracción	% recuperación adicionando después de la extracción	<b>Eficacia de la extracción</b>
C20:3(n3)	95,7	106,6	89,1
C22:0	118,6	132,2	86,4
C22:1(n9)	124,1	145,1	79,0
C20:5(n3)	113,5	128,6	84,9
C23:0	136,1	136,2	99,9
C22:2(n6)	120,8	133,7	87,1
C24:0	139,8	145,3	94,5
C24:1(n9)	130,0	130,9	99,1
C22:6(n6)	125,0	152,7	72,3
Azelaico	103,9	104,9	99,0

Para el caso del nivel intermedio de concentración, los porcentajes de recuperación debidos sólo a la extracción se encuentran entre el 81,0% y el 99,9% para la mayoría de los FAMES estudiados; tan sólo cuatro de ellos están entre el 70,2 y 79%, y de nuevo los valores más bajos se obtienen para el C6:0 (49.7%).

**Tabla 12.** Eficacia de la extracción (% recuperación) para el nivel de concentración superior.

<b>FAME</b>	% recuperación adicionando antes de la extracción	% recuperación adicionando después de la extracción	<b>Eficacia de la extracción</b>
C6:0	27,4	100,7	26,6
C8:0	77,1	105,3	71,8
C10:0	100,7	108,2	92,5
C11:0	106,1	112,3	93,8
C12:0	103,8	109,4	94,4
C13:0	108,0	115,0	93,0
C14:0	106,1	112,9	93,1
C14:1(n5)	110,2	110,4	99,7
C15:0	111,0	120,1	90,9
C15:1(n5)	113,2	125,3	88,0
C16:0	106,2	113,2	92,9
C16:1(n7)	117,4	123,9	93,5
C17:0	113,6	124,9	88,6
C17:1(n7)	117,9	124,2	93,7
C18:0	109,0	118,8	90,1
C18:1(n9;t9)	115,3	122,5	92,8
C18:1(n9)	107,1	118,8	88,3
C18:1(n7)	111,5	124,4	87,0
C18:2(n6;t6)	114,1	127,0	87,1
C18:2(n6)	116,3	131,6	84,8
C18:3(n6)	118,3	130,6	87,7
C18:3(n3)	118,2	135,1	83,1
C20:0	107,2	119,7	87,4
C20:1(n9)	115,9	134,7	81,2
C21:0	94,1	109,3	84,7
C20:2(n6)	110,9	129,8	81,2
C20:3(n6)	120,4	143,0	77,4
C20:4(n6)	118,9	143,0	76,0
C20:3(n3)	115,0	135,2	79,8
C22:0	107,3	125,6	81,7
C22:1(n9)	121,9	143,1	78,8
C20:5(n3)	117,4	140,6	76,8

**Tabla 12.** Continuación

<b>FAME</b>	% recuperación adicionando antes de la extracción	% recuperación adicionando después de la extracción	<b>Eficacia de la extracción</b>
C23:0	120,2	148,1	72,1
C22:2(n6)	112,5	139,0	73,5
C24:0	105,7	126,9	78,8
C24:1(n9)	115,2	140,1	75,1
C22:6(n6)	121,2	148,1	73,1
Azelaico	87,3	98,7	88,5

En el caso del nivel concentración superior, como puede observarse en la Tabla 12, los porcentajes de recuperación debidos al efecto de la extracción que se obtienen son similares a los del caso del nivel intermedio, estando la mayoría de ellos comprendidos entre el 81,2% y el 99,7%, con algunas excepciones que se sitúan entre el 71,8 y 79,8%, y el caso particular del C6:0.

Se puede concluir que el tratamiento de muestra es eficaz, ya que se obtienen buenos porcentajes de recuperación en la mayoría de los casos a los distintos niveles de concentración estudiados, excepto para el C6:0. Puesto que normalmente en las muestras arqueológicas los ácidos grasos se encuentran presentes en concentraciones superiores a las de los niveles intermedios anteriormente indicados, puede afirmarse que el método es adecuado para el análisis de ácidos grasos en muestras de contexto arqueológico.

Por todo ello el **tratamiento de muestra propuesto** es el siguiente:

- Pesar 5 mg de muestra en un tubo eppendorf de 2 mL.
- Añadir en el tubo 100 µL de KOH (MeOH) 1N.
- Agitar 30 segundos en vortex.
- Calentar en el horno 5 minutos a 100°C.
- Dejar enfriar hasta temperatura ambiente.
- Añadir inmediatamente en el mismo tubo 100 µL BF<sub>3</sub> (MeOH) al 14%.
- Agitar 30 segundos en vortex.
- Calentar en el horno 5 minutos a 100°C.
- Dejar enfriar de nuevo hasta temperatura ambiente.
- Añadir 500 µL de hexano y 600 µL de agua desionizada.
- Agitar otros 30 segundos en el vortex.
- Centrifugar 5 minutos a 10°C y 1350 rpm.
- Separar la fase orgánica (es la que contiene a los FAMES) y llevarla a un vial cromatográfico para su análisis por GC-MS.

## **5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

## **5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas tanto cromatográficas como de tratamiento de muestra, lo siguiente que se llevó a cabo fue la validación del método analítico propuesto. Para ello se estudiaron los siguientes parámetros: selectividad, límites de detección y límites de cuantificación, intervalo lineal, efecto matriz, y precisión (repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia).

### **5.1. Selectividad:**

La selectividad del método mide la capacidad del mismo para determinar de manera específica e inequívoca los analitos en la matriz objeto de estudio y distinguirlos de otros compuestos que pudiera contener la muestra. Dada la heterogeneidad de las muestras que pueden estudiarse dentro de un contexto arqueológico, la selectividad se estudió en base a la comparación del tiempo de retención, iones de cuantificación y confirmación así como las proporciones relativas de cada uno de ellos, con los parámetros obtenidos después de inyectar patrones en disolución. Nos ayudamos a su vez de las librerías de espectros del software, cuando se inyectó en modo SCAN. Tanto en el caso de las muestras sometidas al tratamiento de muestra como de aquellas a las que se las adicionó patrón, los analitos se identificaron sin ningún problema en base al tiempo de retención de los picos de FAMES, y de los iones correspondientes, tanto de cuantificación como de confirmación, seguidos en modo SIM.

Para el caso del análisis de muestras (vasijas de la época Vaccea) a las que se adicionaron patrones de los FAMES estudiados, debido a que estos patrones ya están metilados, cuando se adicionaron para llevar a cabo la validación analítica del método, no se efectuó el tratamiento completo de muestra tal y como se ha comentado en el apartado 4.6 de esta memoria, sino que sólo se efectuó la extracción por estar los patrones ya metilados. Al analizar muestras que no había sufrido el proceso de hidrólisis ni de metilación (blanco), se encontraron señales muy débiles de ácidos grasos metilados, normalmente de C16:0 y de C18:0, que tenían que provenir de la muestra puesto que no se había llevado a cabo la etapa de metilación y el blanco de disolvente inyectado previamente no daba señal de ningún FAME. Conviene aclarar que en la naturaleza, los ácidos grasos no están metilados, por lo que no se esperaba que lo estuviesen en los restos orgánicos de los blancos; un posible origen de esta señal no esperada de FAMES es debido a que los microbios poseen en su organismo FAMES que pueden depositarse sobre los granos de tierra [70]. Puesto que las muestras han estado enterradas, al realizar el muestreo es posible que algún grano de tierra se incorporase a las muestras analizadas y de ahí la presencia de FAMES en muestras que no han sido sometidas al proceso de metilación. Por ello, cuando a las muestras se las adicionó patrón fue necesario tener en cuenta esta señal residual, a la hora de calcular los resultados.

**5.2. Límites de detección (LOD) y Límites de cuantificación (LOQ):**

En términos generales, el LOD se define como la concentración de analito que origina una señal significativamente diferente de la del blanco mientras que el LOQ es la concentración que origina una señal a partir de la cual el procedimiento analítico es capaz de cuantificar con la suficiente precisión. En la práctica, una de las formas de calcular estos límites es mediante la relación señal/ruido (S/N); para el caso del LOD la relación S/N ha de ser igual a tres, mientras que para el LOQ esta relación ha de ser igual a 10.

Los límites de detección y de cuantificación fueron determinados experimentalmente en base a los patrones en disolución (Tabla 13) y no en matriz debido, como ya se indicó, a la heterogeneidad de matrices a analizar. Para ello, se inyectaron blancos del disolvente (hexano para la mezcla S37 y el éster metílico del C18:1(n7) y diclorometano para el éster metílico del ácido azelaico) en los que se midió la señal del ruido al tiempo de retención de los analitos; ésta se multiplicó por 3 (LOD) y por 10 (LOQ) y se calculó por comparación de las señales proporcionadas por patrones de concentraciones similares a estos límites calculados, cuál sería la concentración exacta que originaría esa señal. Posteriormente, se prepararon disoluciones de estas concentraciones y se comprobó que efectivamente esos límites se podían alcanzar con el método propuesto.

**Tabla 13.** Límites de detección y de cuantificación de los analitos estudiados en disolvente en µg/L (ppb).

FAME	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
C6:0	0,11	0,38
C8:0	0,06	0,21
C10:0	0,13	0,44
C11:0	0,14	0,46
C12:0	0,27	0,89
C13:0	0,42	1,40
C14:0	0,50	1,67
C14:1(n5)	1,69	5,62
C15:0	0,97	3,24
C15:1(n5)	2,36	7,88
C16:0	0,20	0,68
C16:1(n7)	2,87	9,56
C17:0	0,49	1,64
C17:1(n7)	1,79	5,97
C18:0	0,09	0,29
C18:1(n9;t9)	3,67	12,23
C18:1(n9)	1,86	6,19
C18:1(n7)	10,00	25,00
C18:2(n6;t6)	2,77	9,23
C18:2(n6)	2,48	8,28
C18:3(n6)	3,03	10,10
C18:3(n3)	3,10	10,34
C20:0	0,92	3,08
C20:1(n9)	2,81	9,38
C21:0	0,56	1,85
C20:2(n6)	5,34	17,81
C20:3(n6)	6,67	22,22
C20:4(n6)	7,43	24,78

Tabla 13. Continuación.

FAME	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )
C20:3(n3)	6,61	22,04
C22:0	1,41	4,71
C22:1(n9)	6,02	20,07
C20:5(n3)	9,39	27,31
C23:0	1,33	4,42
C22:2(n6)	3,56	11,85
C24:0	1,83	6,10
C24:1(n9)	6,79	22,64
C22:6(n6)	2,73	9,09
Azelaico	5,06	16,87

Como se puede observar en la Tabla 13, los valores del LOD son en todos los casos inferiores a las 10 ppb, mientras que los del LOQ no superan en ningún caso las 30 ppb, aunque es verdad que en la mayoría de los casos los límites obtenidos son más bajos que esos dos valores; en el caso de los compuestos saturados, los valores de LOD son más bajos ( $\leq 2\text{ppb}$ ) que para el caso de los insaturados ( $\leq 10\text{ppb}$ ). En cualquier caso, estos límites son bastante bajos y permitirían determinar estos compuestos a niveles de traza.

### 5.3. Intervalo lineal:

Como ya se ha expuesto en los dos puntos anteriores de este apartado, debido a la imposibilidad de disponer de una matriz común que reproduzca todas las muestras posibles del contexto arqueológico, la línea de calibrado para estudiar el comportamiento lineal de los analitos se hizo en disolvente; para el caso de la mezcla S37 se realizó tanto en diclorometano (por ser el disolvente de la mezcla comercial) como en hexano (por ser el disolvente elegido como óptimo según se explicó en el apartado 4.2); en ambos casos, los resultados de la línea de calibrado daban valores de coeficientes de determinación ( $R^2$ ) próximos a 1, si bien se obtenían resultados algo mejores cuando se utilizaba hexano como disolvente. Este dato, unido al hecho de que el hexano es menos volátil y permite por tanto mejorar los resultados de precisión intermedia al evaporarse menos, hace que se elija al hexano como el disolvente óptimo para estudiar la linealidad de la mezcla S37 y por ello también se empleó para la línea de calibrado del éster metílico del C18:1(n7). Para el éster metílico del ácido azelaico, la línea de calibrado se efectuó en diclorometano.

Con respecto a los puntos elegidos para preparar estas líneas de calibrado, como límite inferior se tomaron puntos de concentración cercanos a sus LOQ, de tal modo que un mismo patrón de mezcla S37 sirviese como punto inferior de la línea para varios analitos según la proporción presente de cada compuesto en dicha mezcla; a continuación, se prepararon una serie de disoluciones de concentraciones superiores hasta llegar a un valor de 80 ppm de la mezcla de FAMEs, que equivale a 1,6 , 3,2 y 4,8 ppm de los compuestos presentes en un 2%, 4% y 6% respectivamente; no se inyectaron concentraciones por encima de ésta, para evitar sobrepasar la capacidad de la columna, puesto que en pruebas previas realizadas para optimizar las condiciones cromatográficas, residuos de algunos de los compuestos, en especial C16:0 y C18:0, quedaron retenidos en la misma al inyectar cantidades superiores a

80 ppm. Hubo por ello que limpiar la columna, calentando el horno un tiempo prolongado a una temperatura próxima a la máxima recomendada para la columna hasta que en los blancos del disolvente hexano ya no se observaron picos correspondientes a ningún FAME. Para el caso de los ésteres metílicos del ácido azelaico y del C18:1(n7), se trató de tomar un intervalo similar al de la mezcla S37 y donde además el punto inferior estuviese próximo a sus respectivos valores del LOQ. Cada patrón se inyectó por triplicado y la recta obtenida es resultado de la media de estos análisis. Puesto que en GC hay dos tendencias en cuanto a la elección de la señal para realizar las líneas de calibrado, área y altura del pico, se integraron las señales de los FAMES y se tomaron ambos valores para construir las líneas de calibrado de ambas formas. Se compararon los resultados obtenidos en los dos tipos de líneas de calibrado y se eligió aquella que proporcionaba mejores resultados generales cuando se interpolaban patrones de concentración conocida; en el caso de este estudio fueron las líneas de calibrado que se construyeron utilizando las áreas de los FAME (Tabla 14). Se realizó además una "Prueba t" para cada FAME en el caso de la integración en áreas para verificar la tendencia lineal de la regresión, cumpliéndose en todos los casos que  $t_{\text{experimental}} (b/S_b) > t_{\text{crítico}}$  (tabulado), por lo que se acepta que el método es lineal y que hay una ausencia de bias. Los coeficientes de correlación  $R^2$  son siempre mayores de 0,99 lo que indica que la recta de regresión explica una gran proporción de la variación de los datos.

**Tabla 14.** Parámetros de linealidad obtenidos de las líneas de calibrado de los analitos utilizando los datos en áreas.

FAME	Intervalo (µg/L)	Recta (áreas)	R <sup>2</sup>
C6:0	0,4 - 3200	$y = 913405x - 5414,2$	0,9996
C8:0		$y = 1E+06x - 1582,5$	1,0000
C10:0		$y = 1E+06x - 2516,3$	1,0000
C18:0		$y = 1E+06x - 8445,4$	0,9999
C16:0	0,6 - 4800	$y = 1E+06x - 19843$	0,9996
C11:0	1 - 1600	$y = 2E+06x - 3119,3$	0,9995
C13:0		$y = 1E+06x - 7935,9$	0,9996
C17:0		$y = 1E+06x - 17410$	0,9995
C21:0		$y = 966393x - 758,4$	0,9997
C15:0	2 - 1600	$y = 1E+06x - 16275$	0,9997
C12:0	2 - 3200	$y = 1E+06x - 13380$	0,9999
C14:0		$y = 1E+06x - 24659$	0,9997
C20:0		$y = 1E+06x - 26423$	0,9996
C22:0	4 - 3200	$y = 1E+06x - 40711$	0,9991
C23:0	10 - 1600	$y = 821201x - 37697$	0,9962
C14:1(n5)		$y = 577537x - 10486$	0,9998
C15:1(n5)		$y = 608869x - 14722$	0,9995
C16:1(n7)		$y = 456410x - 10138$	0,9996
C17:1(n7)		$y = 526889x - 8348,4$	0,9998
C18:1(n9;t9)		$y = 454270x - 10277$	0,9990
C18:2(n6;t6)		$y = 494179x - 12338$	0,9995
C18:2(n6)		$y = 514394x - 10639$	0,9997
C18:3(n6)		$y = 426458x - 12468$	0,9992
C18:3(n3)		$y = 530186x - 17390$	0,9988
C20:1(n9)		$y = 471050x - 15676$	0,9988
C20:2(n6)		$y = 386520x - 12375$	0,9990

Tabla 14. Continuación.

FAME	Intervalo ( $\mu\text{g/L}$ )	Recta (áreas)	R <sup>2</sup>
C20:3(n6)	20 - 1600	$y = 391534x - 20281$	0,9985
C20:3(n3)		$y = 458156x - 27116$	0,9980
C20:4(n6)		$y = 360938x - 21314$	0,9976
C22:2(n6)		$y = 432058x - 24965$	0,9977
C24:1(n9)		$y = 405716x - 24209$	0,9969
C22:6(n3)		$y = 322600x - 19947$	0,9963
C24:0	20 - 3200	$y = 815393x - 58351$	0,9984
C18:1(n9)		$y = 485033x - 3567,1$	0,9999
C18:1(n7)	25 - 2000	$y = 148961x - 4494,2$	0,9995
Azelaico	38 - 5000	$y = 36046x + 4342,9$	0,9999
C22:1(n9)	100 - 1600	$y = 639201x - 65431$	0,9987
C20:5(n3)		$y = 457119x - 37297$	0,9993

#### 5.4. Efecto matriz:

El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes procedentes de la matriz. Así, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real y el de una disolución del analito puro puede proporcionar distintas respuestas. En el caso del análisis por GC-MS es común la presencia del efecto matriz, debido a que la matriz suele tener bastante influencia sobre la forma de ionizarse del analito, y por tanto afecta a la señal del mismo, cuando se utilizan detectores de MS.

Existen diversas formas de comprobar si se está produciendo o no efecto matriz. Una de ellas es comparar las pendientes de una línea de calibrado preparada en disolvente con una línea de calibrado efectuada en matriz; si los intervalos de confianza de ambas pendientes se solapan, es porque los componentes de la matriz no afectan a la respuesta del analito. La otra forma es adicionar una cantidad conocida del patrón a una muestra después de haberla sometido al tratamiento; de este modo, no se ve afectada por ninguna etapa del proceso de tratamiento de muestra, y de no obtenerse una respuesta próxima al 100% cuando se la compara con la proporcionada por el analito en la misma concentración pero en disolución, será porque la matriz está influyendo en la respuesta instrumental. En este estudio, como se decidió no preparar una línea de calibrado en matriz (ya que cada muestra de un contexto arqueológico tendrá una diferente, y por lo tanto no tendría mucho sentido realizar el estudio para cada uno de ellas ya que se pretende desarrollar un método de análisis aplicable al mayor número de muestras posible), se optó por la segunda de las opciones anteriormente mencionadas. El tratamiento de muestra aplicado a partir de la etapa de extracción se encuentra descrito en el apartado 4.6 de esta memoria, y se realizaron estos estudios de efecto matriz a tres niveles de concentración (inferior, intermedio y superior), que son los mismos que se emplearon para el estudio de la eficacia de la extracción. En la Tabla 15 se recogen los resultados de estas pruebas.

**Tabla 15.** Resultados de los estudios de efecto matriz (%Respuesta).

<b>FAME</b>	Concentración inferior	Concentración intermedia	Concentración superior
C6:0	118,4	100,4	100,7
C8:0	130,5	102,7	105,3
C10:0	107,0	106,6	108,2
C11:0	111,6	110,5	112,3
C12:0	150,8	110,7	109,4
C13:0	149,9	115,0	115,0
C14:0	157,1	116,9	112,9
C14:1(n5)	166,3	121,7	110,4
C15:0	164,1	123,6	120,1
C15:1(n5)	140,8	119,3	125,3
C16:0	169,3	117,2	113,2
C16:1(n7)	171,0	125,7	123,9
C17:0	167,0	126,2	124,9
C17:1(n7)	154,6	124,8	124,2
C18:0	179,4	122,8	118,8
C18:1(n9;t9)	191,2	133,0	122,5
C18:1(n9)	149,9	116,0	118,8
C18:1(n7)	155,5	160,6	124,4
C18:2(n6;t6)	159,3	128,1	127,0
C18:2(n6)	141,3	124,4	131,6
C18:3(n6)	167,6	128,2	130,6
C18:3(n3)	177,4	135,5	135,1
C20:0	145,4	125,4	119,7
C20:1(n9)	156,7	130,7	134,7
C21:0	164,3	132,1	109,3
C20:2(n6)	169,0	130,6	129,8
C20:3(n6)	139,2	132,0	143,0
C20:4(n6)	162,3	147,4	143,0
C20:3(n3)	153,2	106,6	135,2
C22:0	135,7	132,2	125,6
C22:1(n9)	149,5	145,1	143,1
C20:5(n3)	132,0	128,6	140,6
C23:0	152,7	136,2	148,1
C22:2(n6)	100,2	133,7	139,0
C24:0	161,2	145,3	126,9
C24:1(n9)	168,2	130,9	140,1
C22:6(n6)	135,9	152,7	148,1
Azelaico	132,7	104,9	98,7

Se observa cómo el efecto matriz supone un aumento de la señal de los analitos, ya que al comparar las respuestas tal y como se ha comentado previamente, los porcentajes de respuesta son superiores al 100%. Este aumento de la señal es más acusado para las concentraciones inferiores, mientras que para concentraciones superiores e intermedias los resultados son bastante parecidos. Para algunos casos, los porcentajes de respuesta en los niveles intermedio y superior de concentraciones estudiados son próximos al 100%, lo que indica una ausencia de efecto matriz. La existencia de un efecto matriz tan pronunciado, sobre todo a bajas concentraciones, hace que no se pueda cuantificar de manera precisa muestras con la línea de calibrado preparada en disolvente. No obstante, sí que se pueden dar los resultados de los análisis, aunque no de un modo totalmente cuantitativo, por medio del porcentaje relativo de área, que consiste en dividir el área de un compuesto en particular entre la suma de todas las áreas de los compuestos estudiados en la muestra, con lo que el error cometido por el hecho de que no todos los compuestos tengan el mismo efecto matriz

es mínimo y admisible para proporcionar resultados tentativos con los que sacar conclusiones. Y por otro lado, este método de obtención de resultados permite la comparación entre diferentes muestras, ya que el cálculo de porcentajes en muestras, evita que el distinto efecto matriz entre muestras afecte a los resultados.

Cabe destacar que se han descrito los resultados obtenidos sobre una matriz concreta (vasija hallada en una tumba de la época Vaccea), y como se ha comentado anteriormente el estudio del efecto matriz ha de realizarse sobre cada tipo de muestra. Por lo tanto, sería necesario repetir este proceso para tipos de muestras distintas ya que el material del objeto y el efecto del enterramiento no tienen por qué ser iguales. Y si se quisiese cuantificar de manera exacta, se tendría que llevar a cabo el "método de adiciones patrón" (MAP) en el caso que la matriz contenga los analitos, o una línea de calibrado sobre matriz con patrón externo en el caso contrario.

### **5.5. Precisión: repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia.**

La precisión está relacionada con la ausencia de errores aleatorios y se estima con la desviación estándar de los resultados; en la práctica se prefiere el uso de los "coeficientes de variación" (CV) que se calculan como el cociente de la desviación estándar de los datos entre la media de los mismos y multiplicado por 100 si se desea expresar el resultado en tanto por ciento, de manera que el error se hace relativo a la media.

En función de las condiciones en que se mida nos encontramos con:

- Repetibilidad: obtenida al analizar las mismas muestras por triplicado en un período corto de tiempo (mismo día).
- Reproducibilidad: obtenida al analizar por triplicado tres muestras preparadas de la misma manera.
- Precisión intermedia: obtenida al analizar las mismas muestras por triplicado en un intervalo largo de tiempo (5 días).

En nuestro caso, la repetibilidad del método se evaluó a través del cálculo de los CV de tres inyecciones consecutivas de patrones de FAMEs (mezcla S37 y ésteres metílicos del C18:1(n7) y del ácido azelaico) a los tres niveles de concentración anteriormente utilizados en este estudio (inferior, intermedio y superior). Los resultados de los estudios de repetibilidad se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Resultados de los estudios de repetibilidad (n = 3) en patrones en disolución. Concentración (C.) expresada en µg / L.

FAME	C. Inferior	CV (%)	C. Intermedia	CV (%)	C. Superior	CV (%)
C6:0	0,4	5,6	400	0,6	3200	0,7
C8:0	0,4	8,4	400	0,0	3200	0,3
C10:0	0,4	4,2	400	0,3	3200	0,1
C11:0	2	5,5	200	0,7	1600	0,4
C12:0	2	6,8	400	0,5	3200	0,3
C13:0	2	8,6	200	0,9	1600	0,1
C14:0	2	6,9	400	0,0	3200	0,1
C14:1(n5)	10	2,7	200	1,6	1600	0,5
C15:0	2	7,2	200	2,0	1600	0,2
C15:1(n5)	10	9,1	200	1,6	1600	0,1
C16:0	0,6	2,3	600	0,5	4800	0,1
C16:1(n7)	10	4,7	200	4,0	1600	0,3
C17:0	2	5,8	200	0,2	1600	0,2
C17:1(n7)	10	6,2	200	4,3	1600	0,8
C18:0	0,4	5,2	400	0,3	3200	0,1
C18:1(n9;t9)	100	7,9	200	2,9	1600	0,3
C18:1(n9)	20	4,2	400	7,2	3200	0,1
C18:1(n7)	50	6,3	100	2,4	2000	1,3
C18:2(n6;t6)	10	2,9	200	4,0	1600	0,2
C18:2(n6)	10	4,5	200	6,7	1600	0,2
C18:3(n6)	10	4,1	200	1,3	1600	0,1
C18:3(n3)	10	1,3	200	2,3	1600	0,5
C20:0	2	1,4	400	3,1	3200	0,6
C20:1(n9)	10	8,6	200	2,2	1600	0,4
C21:0	10	5,8	200	1,8	1600	0,0
C20:2(n6)	10	6,0	200	3,6	1600	0,3
C20:3(n6)	20	7,0	200	3,6	1600	0,1
C20:4(n6)	20	7,1	200	2,8	1600	0,0
C20:3(n3)	20	6,6	200	2,0	1600	0,4
C22:0	20	7,9	400	2,2	3200	1,0
C22:1(n9)	20	4,2	200	1,8	1600	0,2
C20:5(n3)	100	0,2	200	1,3	1600	0,1
C23:0	10	9,4	200	1,4	1600	0,0
C22:2(n6)	20	1,6	200	2,5	1600	0,7
C24:0	40	0,9	400	1,5	3200	0,0
C24:1(n9)	20	6,0	200	3,1	1600	0,2
C22:6(n6)	100	4,7	200	1,9	1600	0,8
Azelaico	38	5,5	750	3,4	5000	2,5

Como podemos observar en la Tabla 16, los coeficientes de variación no superan en ningún caso el 10% y mejoran, generalmente, con el aumento de la concentración; de hecho, los CV cuando se analizan las concentraciones superiores no llegan al 1%, salvo para dos casos.

También se estudió la repetibilidad a través una muestra, inyectándola por triplicado de manera consecutiva; se inyectó una muestra de los restos de una vasija de una tumba Vaccea. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 17. Como se observa en esta tabla, eran inferiores al 6% para todos los FAMES detectados en la muestra con la excepción del C18:1(n7).

Se puede concluir por tanto, que la repetibilidad del método es buena, tanto para patrones como para muestras.

**Tabla 17.** Resultados de los estudios de repetibilidad (n = 3) en muestras. Concentración (C.) expresada en µg / L.

FAME	% en área	CV (%)
C6:0	1,7	3,8
C8:0	3,3	2,1
C10:0	3,0	2,2
C11:0	0,4	0,8
C12:0	4,7	1,2
C13:0	0,6	1,7
C14:0	9,3	1,3
C15:0	3,8	1,6
C16:0	42,8	2,9
C17:0	1,5	1,3
C18:0	23,9	3,9
C18:1(n9)	4,0	3,4
C18:1(n7)	0,1	9,1
C18:2(n6)	0,5	5,2
C20:0	0,4	4,2
C22:0	0,1	5,3

Con respecto a la reproducibilidad del método, se estudió a través de la preparación por triplicado en el mismo día y su inyección consecutiva por triplicado de una muestra de vasija Vaccea a la que se le adicionaron 10 µL de disolución patrón FAME (mezcla S37 y ésteres metílicos del C18:1(n7) y del ácido azelaico) y luego se llevó a cabo el tratamiento de muestra anteriormente citado. De nuevo, este parámetro se evaluó a tres niveles de concentración: inferior, intermedio y superior, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Resultados de los estudios de reproducibilidad (n = 3). Concentración (C.) expresada en µg / L.

FAME	C. Inferior	CV (%)	C. Intermedia	CV (%)	C. Superior	CV (%)
C6:0	0,4	2,6	400	1,6	3200	2,8
C8:0	0,4	2,2	400	2,9	3200	4,1
C10:0	0,4	3,2	400	3,3	3200	3,8
C11:0	2	3,5	200	1,7	1600	2,4
C12:0	2	4,4	400	2,4	3200	2,2
C13:0	2	3,6	200	2,9	1600	2,1
C14:0	2	3,9	400	2,0	3200	2,2
C14:1(n5)	10	1,7	200	1,3	1600	1,5
C15:0	2	3,8	200	2,0	1600	3,3
C15:1(n5)	10	4,1	200	2,1	1600	2,1
C16:0	0,6	3,4	600	1,5	4800	2,5
C16:1(n7)	10	2,9	200	3,0	1600	2,9
C17:0	2	4,2	200	2,2	1600	3,8
C17:1(n7)	10	4,2	200	2,3	1600	1,8
C18:0	0,4	4,6	400	2,3	3200	3,3
C18:1(n9;t9)	100	4,9	200	1,9	1600	2,3
C18:1(n9)	20	4,0	400	3,2	3200	2,7
C18:1(n7)	50	2,1	100	0,7	2000	4,0
C18:2(n6;t6)	10	1,9	200	2,1	1600	1,2
C18:2(n6)	10	4,3	200	2,0	1600	4,0

Tabla 18. Continuación.

FAME	C. Inferior	CV (%)	C. Intermedia	CV (%)	C. Superior	CV (%)
C18:3(n6)	10	2,1	200	3,7	1600	1,6
C18:3(n3)	10	1,3	400	1,3	3200	1,6
C20:0	2	1,4	200	2,2	1600	1,6
C20:1(n9)	10	4,6	200	3,2	1600	2,1
C21:0	10	3,8	200	1,8	1600	1,4
C20:2(n6)	10	2,0	200	2,6	1600	1,1
C20:3(n6)	20	3,0	200	2,6	1600	2,1
C20:4(n6)	20	3,1	200	1,8	1600	2,4
C20:3(n3)	20	2,6	400	2,0	3200	2,0
C22:0	20	4,9	200	2,3	1600	4,4
C22:1(n9)	20	2,2	200	2,1	1600	2,2
C20:5(n3)	100	1,2	200	1,2	1600	1,1
C23:0	10	4,4	200	2,5	1600	2,0
C22:2(n6)	20	1,0	400	2,6	3200	1,7
C24:0	40	4,3	200	2,6	1600	3,7
C24:1(n9)	20	3,0	200	3,0	1600	2,8
C22:6(n6)	100	2,7	750	1,9	5000	1,8
Azelaico	38	4,0	200	3,7	1600	4,0

Como se puede observar, los valores de CV son inferiores al 5% en todos los casos, por lo que podemos afirmar que el método es reproducible.

Para finalizar, se estudió la precisión intermedia tanto en patrones en disolución como en muestras; para ello, un mismo patrón o muestra se inyectó por triplicado tres días alternos en un lapso de tiempo de cinco días (lunes, miércoles y viernes). Para el caso de los patrones en disolución, se hizo tanto con patrones de la mezcla S37 como con los ésteres metílicos del C18:1(n7) y del ácido azelaico y en todos los casos, para tres niveles de concentración: inferior, intermedio y superior. Los resultados se muestran en la Tabla 19 para patrones en disolución y en la Tabla 20 para muestras reales.

Tabla 19. Resultados de los estudios de precisión intermedia (n = 3) en patrones en disolución. Concentración (C.) expresada en µg / L.

FAME	C. Inferior	CV (%)	C. Intermedia	CV (%)	C. Superior	CV (%)
C6:0	0,4	2,3	400	2,1	3200	2,0
C8:0	0,4	3,0	400	1,2	3200	1,3
C10:0	0,4	2,6	400	1,1	3200	1,5
C11:0	2	5,4	200	0,8	1600	1,6
C12:0	2	2,0	400	0,4	3200	1,7
C13:0	2	3,3	200	0,6	1600	1,8
C14:0	2	3,3	400	0,4	3200	1,7
C14:1(n5)	10	6,8	200	2,3	1600	1,1
C15:0	2	4,7	200	1,9	1600	1,9
C15:1(n5)	10	4,3	200	3,3	1600	1,3
C16:0	0,6	4,1	600	1,6	4800	2,1
C16:1(n7)	10	6,5	200	2,2	1600	2,2
C17:0	2	5,8	200	2,7	1600	2,1
C17:1(n7)	10	7,8	200	1,4	1600	1,8
C18:0	0,4	6,2	400	2,5	3200	2,2
C18:1(n9;t9)	100	7,6	200	1,7	1600	3,0
C18:1(n9)	20	4,4	400	0,7	3200	1,7
C18:1(n7)	50	3,5	100	1,4	2000	1,4

Tabla 19. Continuación.

FAME	C. Inferior	CV (%)	C. Intermedia	CV (%)	C. Superior	CV (%)
C18:2(n6;t6)	10	3,5	200	2,2	1600	2,5
C18:2(n6)	10	2,8	200	3,3	1600	2,6
C18:3(n6)	10	1,9	400	3,7	3200	2,4
C18:3(n3)	10	4,9	200	3,0	1600	2,9
C20:0	2	3,3	400	3,8	3200	2,7
C20:1(n9)	10	3,4	200	6,2	1600	1,4
C21:0	10	4,6	200	2,1	1600	3,2
C20:2(n6)	10	5,2	200	2,0	1600	2,8
C20:3(n6)	20	6,3	200	1,8	1600	2,4
C20:4(n6)	20	7,5	200	2,8	1600	3,2
C20:3(n3)	20	9,8	200	2,4	1600	3,2
C22:0	20	8,5	400	4,4	3200	2,3
C22:1(n9)	20	7,2	200	3,4	1600	2,1
C20:5(n3)	100	4,0	200	1,7	1600	3,3
C23:0	10	1,8	200	4,6	1600	2,9
C22:2(n6)	20	7,0	200	1,4	1600	2,5
C24:0	40	7,6	400	3,9	3200	3,4
C24:1(n9)	20	2,6	200	1,3	1600	3,1
C22:6(n6)	100	5,4	200	0,5	1600	2,5
Azelaico	38	4,0	750	1,9	5000	1,8

Examinando la tabla, todos los CV de la mezcla S37 y del éster metílico del C18:1(n7) son inferiores al 10%, lo que permite afirmar que las disoluciones son estables en el congelador durante, al menos, una semana. Para el caso de las concentraciones superiores e intermedias, los CV están por debajo del 5% excepto para el C20:1(n9) de la concentración intermedia; mientras que para las concentraciones inferiores, hay 16 FAMEs cuyo %CV está entre el 5 y el 10%, y el resto son inferiores al 5%. Los estudios de precisión intermedia sobre muestras que se inyectaron por triplicado a lo largo de tres días alternos durante cinco días, proporcionaron los resultados recogidos en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados de los estudios de precisión intermedia (n = 3) en muestras. Concentración (C.) expresada en  $\mu\text{g} / \text{L}$ .

FAME	% en área	CV (%)
C6:0	1,7	5,5
C8:0	3,3	5,4
C10:0	3,0	6,5
C11:0	0,4	4,4
C12:0	4,7	6,9
C13:0	0,6	5,5
C14:0	9,3	7,1
C15:0	3,8	7,9
C16:0	42,8	7,4
C17:0	1,5	7,8
C18:0	23,9	9,0
C18:1(n9)	4,0	8,1
C18:1(n7)	0,1	6,5
C18:2(n6)	0,5	9,9
C20:0	0,4	9,6
C22:0	0,1	7,4

Como puede observarse, la muestra proporcionaba unos valores de CV inferiores al 10% en todos los casos, por lo que se puede concluir que la precisión intermedia del método es adecuada para analizar muestras.

Estudiados los tres parámetros que definen la precisión, podríamos afirmar que estamos ante un método preciso ya que tanto para la repetibilidad, como para la reproducibilidad y la precisión intermedia, los CV obtenidos a tres niveles de concentración son menores del 10%, y por este motivo no es necesario utilizar un patrón interno.

## **6. APLICACIÓN DEL ESTUDIO A MUESTRAS REALES**

## **6. APLICACIÓN DEL ESTUDIO AL ANÁLISIS DE MUESTRAS**

Con el método anteriormente propuesto, se ha analizado el perfil de ácidos grasos de un total de 25 muestras reales procedentes de dos contextos arqueológicos diferentes:

- 6 muestras procedían de pinturas murales de iglesias de la Comarca de Sayago (Zamora), proporcionadas por el "Centro de Conservación y Restauración de Bienes Culturales de Castilla y León".
- 19 muestras procedían de fragmentos de vasijas de tumbas Vacceas del yacimiento de Pintia (Padilla de Duero, Valladolid), proporcionadas por el "Centro de Estudios Vacceos Federico Wattenberg".

Las muestras se analizaron con el método descrito en esta memoria tal y como se recibieron; la etapa de muestreo la realizaron los técnicos de cada uno de los centros anteriormente mencionados, y la única manipulación que se realizó en nuestro laboratorio fue molerlas para lograr su homogenización. El porcentaje en áreas de los FAMES proporcionados por alguna de dichas muestras se recogen a continuación en las Tablas 21 y 22.

**Tabla 21.** Porcentajes en área de los FAMES encontrados en las muestras de pinturas murales.

<b>FAME</b>	441.U.C1	441.U.A3	441.2.A4	441.22.A1	441.23.A1	441.1.D1
C8:0	4,5	2,6	1,8	1,5	1,4	1,8
C12:0	4,1	2,5	2,6	1,9	3,6	3,7
C13:0	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2
C14:0	10,9	6,0	7,9	8,6	8,0	6,0
C15:0	1,6	0,9	1,9	0,9	1,1	1,3
C16:0	38,3	37,6	42,4	41,1	47,1	41,6
C17:0	1,2	0,8	1,3	1,2	1,0	1,3
C18:0	36,2	36,2	38,1	40,5	28,5	42,1
C18:1(n9)	1,0	1,4	2,9	1,9	4,0	1,2
C20:0	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
C21:0	ND	ND	ND	ND	0,1	0,1
C22:0	0,1	0,3	ND	0,1	0,4	0,1
C24:0	0,1	0,2	0,3	ND	2,5	0,1
Azelaico	1,2	10,7	1,1	1,6	1,2	1,8

ND: No detectado

**Tabla 22.** Porcentajes en área de los FAMES encontrados en las muestras de vasijas Vacceas del yacimiento de Pintia.

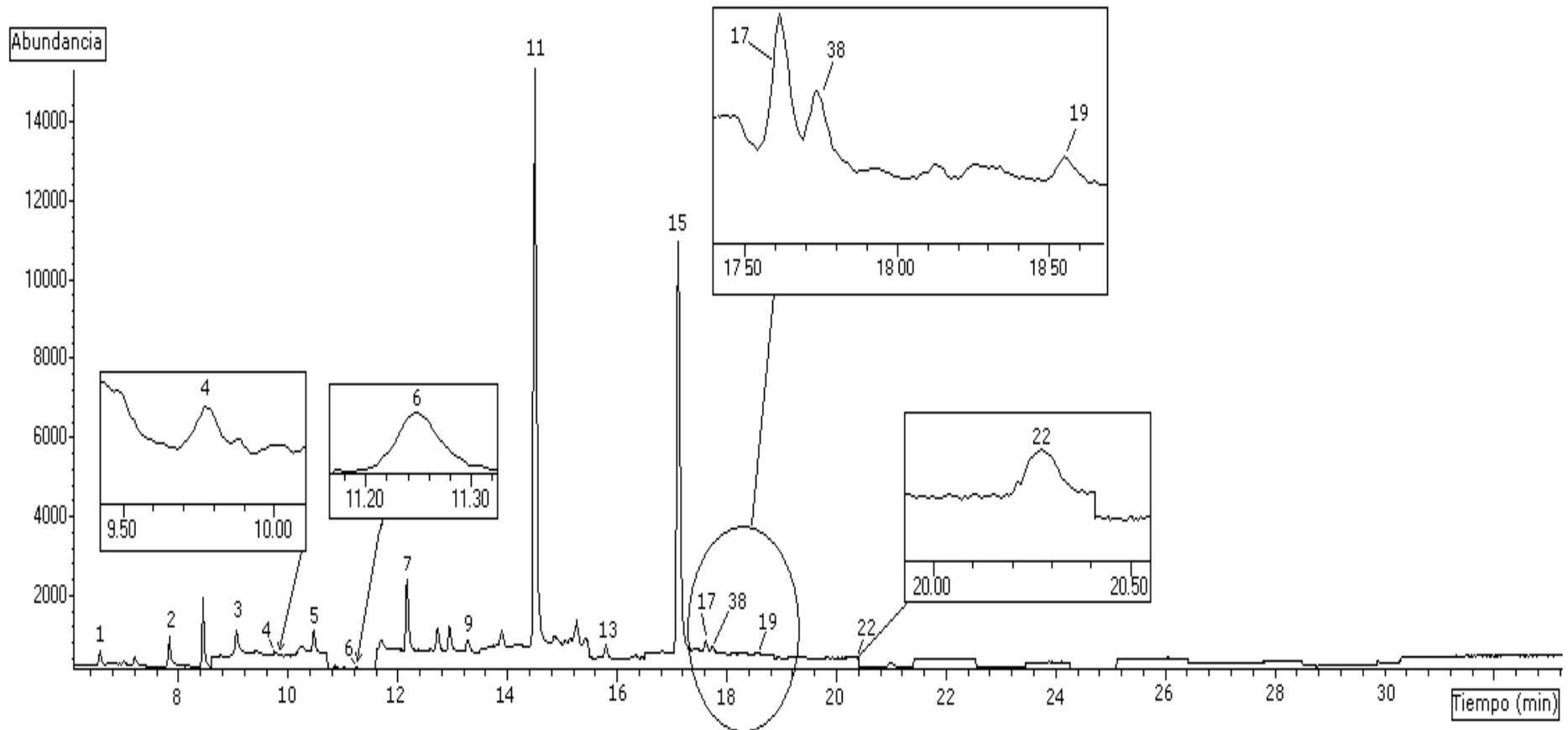
FAME	314 a	433 a	760 a	834 a	969 a	973
C6:0	1,7	1,0	3,9	0,8	2,1	1,3
C8:0	3,3	4,0	6,4	1,7	2,4	2,4
C10:0	3,0	1,2	19,7	1,7	1,5	1,9
C11:0	0,4	ND	0,9	0,3	0,3	ND
C12:0	4,7	1,7	11,2	1,8	3,3	3,5
C13:0	0,6	0,1	0,5	0,2	0,2	0,3
C14:0	9,3	3,4	6,0	5,3	6,4	5,3
C15:0	3,8	0,8	0,7	1,0	1,7	1,0
C16:0	42,8	35,5	27,2	44,5	42,8	39,0
C16:1(n5)	ND	0,4	ND	ND	ND	ND
C17:0	1,5	1,0	0,8	1,1	1,3	1,3
C18:0	23,9	35,4	21,5	40,2	35,4	41,8
C18:1(n9)	4,0	2,2	0,6	0,6	1,5	1,2
C18:1(n7)	0,1	0,8	0,1	0,3	0,3	0,1
C18:2(n6)	0,5	1,2	0,1	0,1	0,3	0,3
C20:0	0,4	3,4	0,3	0,3	0,7	0,8
C21:0	ND	0,3	ND	ND	ND	ND
C22:0	0,1	5,3	ND	ND	ND	ND
C23:0	ND	0,5	ND	ND	ND	ND
C24:0	ND	2,0	ND	ND	ND	ND

ND: No detectado

A modo de ejemplo se muestra un cromatograma de la muestra 834a (vasija Vaccea) en la Figura 7.

La interpretación de estos resultados deben hacerse con mucha cautela, ya que el perfil de los ácidos grasos puede verse modificado con respecto al que tenían originalmente los restos orgánicos debido a que pudieron ser cocinados o procesados, a la posible mezcla con otros restos, a la limpieza que se le dio al objeto, así como a la biodegradación, lixiviación e impregnación de tierra o agua de los alrededores en los que fue enterrado el recipiente [21]. Además, no todos los ácidos grasos se lixivian por igual puesto que el C16:0 es dos veces más soluble en agua que el C18:0 [20], ni tampoco se degradan por igual ya que los insaturados lo hacen más rápido que los saturados, aumentando la velocidad casi 10 veces por cada doble enlace [19].

Por ello, una de las mejores formas para extraer conclusiones es establecer relaciones entre los ácidos grasos que se degraden a la misma velocidad, como son el C16:0 (ácido palmítico, P) y C18:0 (ácido esteárico, S) y compararlo con el de una muestra actual. La relación P/S es una de las más comunes usadas en la bibliografía [9, 19, 25, 71] para discernir si el origen de los restos orgánicos es vegetal, animal terrestre o animal marino.



**Figura 7.** Cromatograma de una muestra real de vasija Vaccea analizada por GC-MS. FAMES identificados: **1.** C6:0, **2.** C8:0, **3.** C10:0, **4.** C11:0, **5.** C12:0, **6.** C13:0, **7.** C14:0, **9.** C15:0, **11.** C16:0, **13.** C17:0, **15.** C18:0, **17.** C18:1(n9), **38.** C18:1(n7), **19.** C18:2(n6), **22.** C22:0.

No obstante, debido a la posible lixiviación del C16:0, esta relación puede verse modificada con el paso del tiempo en función de las condiciones climatológicas de la zona donde se tomó la muestra, llegando a reducirse a la mitad [4]. Por ello, han de tenerse en cuenta también otros factores discriminativos: en el caso de muestras de origen animal hay que distinguir primero entre animales terrestres o marinos. Los animales marinos presentan una relación P/S < 0,48 mientras que los terrestres la presentan mayor que este valor [25]. Entre animales y vegetales la separación es más difícil. Si las muestras son recientes, en las plantas hay una gran abundancia de C18:2, el cual está presente en la mayoría de los casos en una proporción mayor que el C16:0 mientras que en los animales el C18:2 es mucho menor que el C16:0 [72]. Sin embargo estas conclusiones no son válidas en un contexto arqueológico, ya que el C18:2 se habrá degradado. Se pueden utilizar para distinguir muestras de origen animal o vegetal los ácidos grasos de cadena impar, ya que en las plantas de estar presentes predominarían el C11:0 y C13:0 [73], mientras que en los rumiantes el C15:0 y C17:0. También son útiles para realizar esta tarea los ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos saturados de plantas consisten fundamentalmente en ácidos grasos de cadena larga (> C20:0), mientras que la grasa del tejido adiposo de animales así como las semillas y nueces se caracterizan por ácidos grasos de cadena más corta (< C20:0) [71]. Sin embargo, y dada la evidente degradación de los ácidos grasos insaturados, es mejor emplear como distintivo del mundo animal y vegetal el ácido azelaico, producto de degradación del C18:1, C18:2 y C18:3 y típico en los aceites de semillas que contienen elevadas cantidades del mismo. El ácido azelaico apenas se encuentra en restos de animales, mientras que en muestras de origen vegetal la proporción de azelaico es similar a la de C16:0 [43]. Puede estar también presente en bajas proporciones en la cera de abeja [49]. Finalmente cabe destacar que para distinguir cera de abeja se utiliza como biomarcador el C24:0 [60], mientras que el C22:0 es propio de ceras vegetales [30].

Para distinguir si las muestras de origen animal terrestre pertenecen a una familia de animales u otra, hay que tener también en cuenta otros factores excluyentes: **i)** los animales rumiantes presentan ácidos grasos de cadena impar por el metabolismo del rumen bacteriano, en especial C15:0 y C17:0, mientras que los no rumiantes no [47]; **ii)** los animales no rumiantes presentan un único isómero del C18:1, el *cis*-9, mientras que los rumiantes presentan mezclas de isómeros de dicho compuesto [67]; **iii)** dentro de los animales rumiantes, puede distinguirse también si la grasa es del tejido adiposo o es de un derivado lácteo, ya que en los derivados lácteos se encuentran ácidos grasos de cadena corta, como el C6:0, C8:0 y C10:0, mientras que en el tejido adiposo estos ácidos grasos de cadena corta raramente han sido detectados en muestras arqueológicas por perderse debido a su elevada volatilidad [67]. Puede además saberse si el derivado lácteo es de vaca mediante la relación C12:0/C10:0 que será mayor que 1, o de cabra u oveja si la relación C12:0/C10:0 es menor que 1 [68].

Teniendo en cuenta toda la bibliografía antes indicada y en base a los resultados de las Tablas 21 y 22, se podría concluir de modo tentativo que las muestras de vasijas *Vacceas* podrían haber contenido algún derivado lácteo de rumiante, en concreto de cabra u oveja en la muestra 760a (C12:0<C10:0), y de vaca para las demás (C10:0<C12:0). Estos resultados viene confirmados por la presencia de ácidos grasos de cadena corta impares C15:0 y C17:0, por la mezcla de isómeros del C18:1 (hay *cis*-11 ó n7 y *cis*-9 ó n9) y a la relación P/S ~ 1,5 (justo la mitad de 3, éste último valor encontrado en la bibliografía para la leche de vaca [63]). Además, las muestras 314a y 433a presentan restos de C22:0, indicativo de ceras vegetales, aunque la proporción es mayor en la muestra 433a. En esta última muestra también se ha detectado el C24:0 indicativo de cera de abeja. Estos datos pueden sugerir una posible multifuncionalidad de la vasija, el que se usaron las ceras para recubrir o sellar el objeto, o también es posible que hubiesen empleado miel, que contiene cera de abeja, como edulcorante para la leche [28].

Con respecto a las muestras de pintura mural de Sayago, podría deducirse que no es resto vegetal por la baja proporción de ácido azelaico. Además, como todas las muestras contienen C24:0 (excepto la 441.22.A1), podría pensarse en el posible uso de cera de abeja como aglutinante de la pintura.

## **7. CONCLUSIONES GENERALES**

## **7. CONCLUSIONES GENERALES**

- Se ha desarrollado, optimizado y validado un método analítico para determinar 38 ácidos grasos en muestras de contexto arqueológico.
- El tratamiento de muestra propuesto consiste en una hidrólisis con KOH (MeOH), seguido de una derivatización a ésteres metílicos (FAMES) con BF<sub>3</sub> (MeOH), y una etapa de extracción con hexano.
- Los FAMES fueron analizados por GC-MS, utilizando las condiciones que se optimizaron en este trabajo, y que permitieron la separación e identificación de los 38 FAMES en menos de 36 minutos, lo que permite reducir a casi a la mitad el tiempo de análisis, con respecto al obtenido con el método anteriormente utilizado por el grupo de investigación.
- El método propuesto se ha validado, y se ha comprobado que es selectivo, preciso y reproducible. Además se han obtenido porcentajes de recuperación superiores al 70% (excepto para el C6:0), siendo normalmente del 80 al 99%, y con LODs del orden de las ppb (µg/L) en la mayoría de los casos.
- Se ha comprobado la existencia de efecto matriz para una muestra concreta de vasija, lo que indica la necesidad de utilizar el método de adiciones patrón (MAP) si se desea realizar la cuantificación de los FAMES de un modo preciso.
- Con el método propuesto se han analizado muestras arqueológicas de dos procedencias distintas: vasijas encontradas en tumbas pertenecientes al yacimiento Vacceo de Pintia (Valladolid), y pinturas murales de una iglesia de la Comarca de Sayago (Zamora). Se ha tratado además de dar respuesta al posible origen de los restos analizados, concluyéndose que para el caso de las vasijas podrían haber contenido derivados lácteos de rumiantes, mientras que para el análisis de las pinturas murales se ha propuesto que el aglutinante usado en las mismas fuese la cera de abeja.

## **8. SIMBOLOGÍA EMPLEADA**

## **8. SIMBOLOGÍA EMPLEADA**

**APCI:** Ionización química a presión atmosférica.

**BSTFA:** N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida.

**CV:** Coeficiente de variación.

**DAD:** Detector de diodos alineados.

**FAME:** Ésteres metílicos de ácidos grasos (*fatty acid methyl esters*).

**FID:** Detector de ionización en llama.

**FLD:** Detector de fluorescencia.

**GC:** Cromatografía de gases.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución.

**IRMS:** Espectrometría de masas de relaciones isotópicas.

**LOD:** Límite de detección.

**LOQ:** Límite de cuantificación.

**MeOH:** Metanol.

**MS:** Espectrometría de masas.

**ppb:** Parte por billón ( $\mu\text{g} / \text{L}$ ).

**ppm:** Parte por millón ( $\text{mg} / \text{L}$ ).

**SIM:** Selected ion monitoring.

**TESEA:** Técnicas de separación y análisis aplicado.

**TMCS:** Trimetilclorosilano.

**TMSH:** Hidróxido de trimetilsulfonio.

**Tr:** Tiempo de retención.

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

[1] M.Pollard, C.Batt, B.Stern, S.M.M.Young, *Analytical Chemistry in Archaeology*, Cambridge, 2007.

[2] <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>

[3] <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/cromatog.pdf>

[4] J.W.Eerkens, *GC-MS analysis and fatty acid ratios of archaeological potsherds from the western Great Basin of North America*, *Archaeometry*, 2005, 47, 1, 83–102.

[5] H.A.Hoekman-Sites, J.I. Giblin, *Prehistoric animal use on the Great Hungarian Plain: A synthesis of isotope and residue analyses from the Neolithic and Copper Age*, *Journal of Anthropological Archaeology*, 2012, 31, 515–527.

[6] R.P.Evershed, *Organic residues analysis in archaeology: the archaeological biomarker revolution*, *Archaeometry*, 2008, 50, 6, 895 – 924.

[7] I.Jerkovic, Z.Marijanovic, M.Gugic, M.Roje, *Chemical Profile of the Organic Residue from Ancient Amphora Found in the Adriatic Sea Determined by Direct GC and GC-MS Analysis*, *Molecules*, 2011, 16, 7936-7948.

[8] K.Romanus, J.Baeten, J.Poblome, S.Accardo, P.Degryse, P.Jacobs, D.De Vos, M.Waelkens, *Wine and olive oil permeation in pitched and non-pitched ceramics: relation with results from archaeological amphorae from Sagalassos, Turkey*, *Journal of Archaeological Science*, 2009, 36, 900 - 909.

[9] M.P.Colombini, F.Modugno, *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*, 2009, Wiley.

[10] Ákos Pető, Ferenc Gyulai, Dániel Pópity, Árpád Kenéz, *Macro- and micro-archaeobotanical study of a vessel content from a Late Neolithic structured deposition from southeastern Hungary*, *Journal of Archaeological Science*, 2013, 40, 58 – 71.

[11] J. Kolar, J. Malesic, D. Kocar, M. Strlic, G. De Bruin, D. Kolesa, *Characterisation of paper containing iron gall ink using size exclusion chromatography*, *Polymer Degradation and Stability*, 2012, 97, 2212 – 2216.

[12] M.Regert, N.Garnier, O.Decavallas, C.Cren-Olivé, C.Rolando, *Structural characterization of lipid constituents from natural substances preserved in archaeological environments*, *Measurement Science and Technology*, 2003, 14, 1620–1630.

- [13] R.P.Evershed, *Experimental approaches to the interpretation of absorbed organic residues in archaeological ceramics*, *World Archaeology*, 2008, 40 (1), 26-47.
- [14] F.A.Hansel, R.P. Evershed, *Formation of dihydroxy acids from Z-monounsaturated alkenoic acids and their use as biomarkers for the processing of marine commodities in archaeological pottery vessels*, *Tetrahedron Letters*, 2009, 50, 5562–5564.
- [15] M.Regert, H.A.Bland, S.N.Dudd, P.F.van Bergen, R.P.Evershed, *Free and bound fatty acid oxidation products in archaeological ceramic vessels*, *Proceedings of Royal Society London*, 1998, 265, 2027 – 2032.
- [16] F.A.Hansel, I.D. Bull, R.P. Evershed, *Gas chromatographic mass spectrometric detection of dihydroxy fatty acids preserved in the 'bound' phase of organic residues of archaeological pottery vessels*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, 25, 1893–1898.
- [17] T.Buonasera, *Investigating the presence of ancient absorbed organic residues in groundstone using GC-MS and other analytical techniques: a residue study of several prehistoric milling tools from central California*, *Journal of Archaeological Science*, 2007, 34, 1379 – 1390.
- [18] M.Regert, *Analytical strategies for discriminating archaeological substances from animal origin*, *Mass Spectrometry Reviews*, 2009, 30, 177– 220.
- [19] B.Koirala, J.Rosentreter, *Examination of prehistoric artifacts via fatty acid methyl ester (FAME) techniques using modern environmental stewardship*, *Journal of Archaeological Science*, 2009, 36, 1229–1242.
- [20] V.J.Steele, B.Stern, A.W.Stott, *Olive oil or lard?: Distinguishing plant oils from animal fats in the archeological record of the eastern Mediterranean*, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2010, 24, 3478–3484.
- [21] T.F.M.Oudemans, J.J.Bon, *Molecular archaeology: analysis of charred (food) remains from prehistoric pottery by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry*, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1991, 20, 197-227.
- [22] S.N.Dudd, M.Regert, R.P.Evershed, *Assessing microbial lipid contributions during laboratory degradations of fats and oils and pure triacylglycerols absorbed in ceramic potsherds*, *Organic Geochemistry*, 1998, 29, 1345-1354.
- [23] K.Kimpe, C.Drybooms, E.Schrevens, P.A.Jacobs, R.Degeest, M.Waelkens, *Assessing the relationship between form and use of different kinds of pottery from the archaeological site Sagalassos (southwest Turkey) with lipid analysis*, *Journal of Archaeological Science*, 2004, 31, 1503 – 1510.

- [24] L.Salvini, A.Pecci, G.Giorgi, *Cooking activities during the Middle Ages: organic residues in ceramic vessels from the Sant'Antimo Church*, Journal of Mass Spectrometry, 2008, 43, 108–115.
- [25] M.Olson, S.Isaksson, *Molecular and isotopic traces of cooking and consumption of fish at an Early Medieval manor site in eastern middle Sweden*, Journal of Archaeological Science, 35, 773 – 780.
- [26] S.E.Fraser, T.Insoll, A.Thompson, B.E. van Dongen, *Organic geochemical analysis of archaeological medicine pots from Northern Ghana. The multi-functionality of pottery*, Journal of Archaeological Science, 2012, 39, 2506 – 2514.
- [27] K.Kimpe, P.A.Jacobs, W.Waelkens, *Mass spectrometric methods prove the use of beeswax and ruminant fat in late Roman cooking pots*, Journal of Chromatography A, 2002, 968, 151–160.
- [28] M.S.Copley, R.Berstan, S.N.Dudd, V.Straker, S.Payner, R.P.Evershed, *Dairying in antiquity. I. Evidence from absorbed lipid residues dating to the British Iron Age*, Journal of Archaeological Science, 2005, 32, 485–503.
- [29] <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/whatlip/index.htm>
- [30] <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/lipidos/acidosgrasos.html>
- [31] <http://che1.lf1.cuni.cz/html/Lipids02.pdf>
- [32] [http://www.uco.es/master\\_nutricion/nb/Mataix/lipidos.pdf](http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Mataix/lipidos.pdf)
- [33] R.P.Mensink, M.B.Katan, *Trans monounsaturated fatty acids in nutrition and their impact on serum lipoprotein levels in man*, Progress in Lipid Research, 1993, 32, 1, 111-122.
- [34] E.A.Reber, M.T. Kerr, *The persistence of caffeine in experimentally produced black drink residues*, Journal of Archaeological Science, 2012, 39, 2312 – 2319.
- [35] F.C.Izzo, E.Zendri, A.Bernardi, E.Balliana, M.Sgobbi, *The study of pitch via gas chromatography-mass spectrometry and Fourier transformed infrared spectroscopy: the case of the Roman amphoras from Monte Poro, Calabria (Italy)*, Journal of Archaeological Science, 2013, 40, 595 – 600.
- [36] A.Pecci, G.Giorgi, L.Salvini, M.A.Cau Ontiveros, *Identifying wine markers in ceramics and plasters using gas chromatography-mass spectrometry. Experimental and archaeological materials*, Journal of Archaeological Science xxx, 2012, 1 – 7.

- [37] E.Ribechini, J.Perez-Arategui, M.P. Colombini, *Gas chromatography/mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry for the chemical characterisation of modern and archaeological figs (Ficus carica)*, Journal of Chromatography A, 2011, 1218, 3915–3922.
- [38] M.W.Gregg, G.F.Slater, *A new method for extraction, isolation and transesterification of free fatty acids from archaeological pottery*, Archaeometry, 2010, 52, 833 – 854.
- [39] M.W.Gregg, E.B.Banning, K.Gibbs, G.F. Slater, *Subsistence practices and pottery use in Neolithic Jordan: molecular and isotopic evidence*, Journal of Archaeological Science, 2009, 36, 937–946.
- [40] A.Pecci, M.A.Cau Ontiveros, C.Valdambrini, F.Inserra, *Understanding residues of oil production: chemical analyses of floors in traditional mills*, Journal of Archaeological Science, 2013, 40, 883 – 893.
- [41] H.Brecoulaki, A. Andreotti, I. Bonaduce, M.P. Colombini, A. Lluveras, *Characterization of organic media in the wall-paintings of the "Palace of Nestor" at Pylos, Greece: evidence for a secco painting techniques in the Bronze Age*, Journal of Archaeological Science, 2012, 39, 2866 – 2876.
- [42] M. Abdel-Ghani, H.G.M. Edward, B. Stern, R. Janaway, *Characterization of paint and varnish on a medieval Coptic-Byzantine icon: Novel usage of dammar resin*, Spectrochimica Acta Part A, 2009, 73, 566–575.
- [43] L.Valianou, S,Wei , M.S. Mubarak, H.Farmakalidis, E.Rosenberg, S.Stassinopoulos, I.Karapanagiotis, *Identification of organic materials in icons of the Cretan School of iconography*, Journal of Archaeological Science, 2011, 38, 246 – 254.
- [44] A.Charrié-Duhaut, *Molecular and isotopic archaeology: Top grade tools to investigate organic archaeological materials*, Comptes Rendus Chimie, 2009, 12, 1140 – 1153.
- [45] V.Pitthard, R.Stoneb, S.Stanek, M.Griesser, C.Kryza-Gerschd, H. Hanzerd, *Organic patinas on Renaissance and Baroque bronzes–Interpretation of compositions of the original patination by using a set of simulated varnished bronze coupons*, Journal of Cultural Heritage, 2011, 12, 44–53.
- [46] J.P. Echard , C. Benoit , J. Peris-Vicente c, V. Malecki, J.V. Gimeno-Adelantado, S. Vaiedelich, *Gas chromatography/mass spectrometry characterization of historical varnishes of ancient Italian lutes and violin*, Analytica Chimica Acta, 2007, 584, 172–180.

- [47] M.P.Babot, S.Hocsman, G.R.Cattáneo, *Assessing the life history of projectile points/knives from the Middle Holocene of Argentina's Southern Puna*, Quaternary International xxx, 2012, 1 – 17.
- [48] R.J.Stacey, *The composition of some Roman medicines: evidence for Pliny's Punic wax?*, Analytical Bioanalytical Chemistry, 2011, 401, 749–1759.
- [49] E.Ribechini, F.Modugno, M.P.Colombini, R.P. Evershed, *Gas chromatographic and mass spectrometric investigations of organic residues from Roman glass unguentaria*, Journal of Chromatography A, 2008, 1183, 158–169.
- [50] E.Ribechini, F.Modugno, J.Pérez-Arantegui, M,P.Colombini, *Discovering the composition of ancient cosmetics and remedies: analytical techniques and materials*, Analytical Bioanalytical Chemistry, 2011, 401, 1727–1738.
- [51] K.L.Rasmussen, A.Lliveras Tenorio, I.Bonaduce, M.P.Colombini, L.Birolo, E.Galano, A.Amoesano, G.Doudna, A.D. Bond, V.Palleschi, G.Lorenzetti, S.Legnaioli, J.van der Plicht, J.Gunneweg *The constituents of the ink from a Qumran inkwell: new prospects for provenancing the ink on the Dead Sea Scrolls*, Journal of Archaeological Science, 2012, 39, 2956 – 2968.
- [52] D.H.Ubelaker, K.M.Zarenko, *Adipocere: What is known after over two centuries of research*, Forensic Science International, 2011, 208, 167–172.
- [53] J.E.Spangenberg, M.Ferrer, P.Tschudin, M.Volken, A.Hafner, *Microstructural, chemical and isotopic evidence for the origin of late neolithic leather recovered from an icefield in the Swiss Alps*, Journal of Archaeological Science, 2010, 37, 1851–1865.
- [54] C.Papageorgopoulou, N.I.Xirotiris, P.X.Iten, M.R.Baumgartner, M.Schmid, F.Rühli, *Indications of embalming in Roman Greece by physical, chemical and histological analysis*, Journal of Archaeological Science, 2009, 36, 35–42.
- [55] I.Surowiec, *Application of high-performance separation techniques in archaeometry*, Microchimia Acta, 2008, 162, 289–302.
- [56] I.D. van der Werf, C.D. Calvano, R.Laviano, A.Simonetti, L.Sabbatini, *Multi-technique chemical characterisation of a 12–13th-century painted Crucifix*, Microchemical Journal, 2013, 106, 87–94.
- [57] I.D. van der Werf, R.Gnisci, D.Marano, G.E. De Benedetto, R.Laviano, D.Pellerano, F.Vona, F.Pellegrino, E.Andriani, I.M.Catalano, A.F.Pellerano, L.Sabbatini, *San Francesco d'Assisi (Apulia, South Italy): Study of a manipulated 13th century panel painting by complementary diagnostic techniques*, Journal of Cultural Heritage, 2008, 9, 162 – 171.

- [58] J.Pérez-Arantegui, E.Ribechini,, M.P.Colombini, F.Escudero, *Characterization of an ancient 'chemical' preparation: pigments and drugs in medieval Islamic Spain*, Journal of Archaeological Science, 2011, 38, 3350 – 3357.
- [59] E.Ribechini, S.Orsini, F.Silvano, M.P.Colombini, *Py-GC/MS, GC/MS and FTIR investigations on LATE Roman-Egyptian adhesives from opus sectile: New insights into ancient recipes and technologies*, Analytica Chimica Acta, 2009, 638, 79–87.
- [60] D.Namdar, R.Neumann, Y.Goren, S.Weiner, *The contents of unusual cone-shaped vessels (cornets) from the Chalcolithic of the southern Levant*, Journal of Archaeological Science, 2009, 36, 629–636.
- [61] A.K. Outram, A.Kasparov, N.A. Stear, V.Varfolomeev, E.Usmanova, R.P. Evershed, *Patterns of pastoralism in later Bronze Age Kazakhstan: new evidence from faunal and lipid residue analyses*, Journal of Archaeological Science, 2012, 39, 2424 – 2435.
- [62] S.Mirabaud, C.Rolando, M.Regert, *Molecular Criteria for Discriminating Adipose Fat and Milk from Different Species by NanoESI MS and MS/MS of Their Triacylglycerols: Application to Archaeological Remains*, Analytical Chemistry, 2007, 79, 6182-6192.
- [63] K.Romanus, J. Poblome, K.Verbeke, A. Luybaerts, P.Jacobs, D.De Vos, M.Waelkens, *An evaluation of analytical and interpretative methodologies for the extraction and identification of lipids associated with pottery sherds from the site of Sagalassos, Turkey*, Archaeometry, 2007, 49, 4, 729–747.
- [64] O.E.Craig, R.B. Allen, A.Thompson, R.E. Stevens, V.J. Steele, C.Heron, *Distinguishing wild ruminant lipids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry*, Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2012, 26, 2359–2364.
- [65] F.Saliu, F.Modugno, M.Orlandi, M.P.Colombini, *HPLC–APCI-MS analysis of triacylglycerols (TAGs) in historical pharmaceutical ointments from the eighteenth century*, Analytical Bioanalytical Chemistry, 2011, 401, 1785–1800.
- [66] M.T.Doménech-Carbó, *Novel analytical methods for characterising binding media and protective coatings in artworks*, Analytica Chimica Acta, 2008, 621, 109–139.
- [67] R.P.Evershed, S.N.Dudd, M.S.Copley, R.Berstan, A.W.Stott, H.Mottram, S.A.Buckley, Z.Crossman, *Chemistry of Archaeological Animal Fats*, Accounts of Chemical Research, 2002, 35, 660-668.
- [68] R.L.Wolff, *Content and distribution of trans-18:1 acids in ruminant milk and meat fats. Their importance in European diets and their effect on human milk*, JAOCS, 1995, 72, 3, 259-272.

[69] W.R.Morrison, L.M.Smith, *Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol*, Journal of Lipid Research, 1964, 5, 600-608.

[70] [http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq\\_no\\_115=72785](http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=72785)

[71] B.Hjulström, S.Isaksson, *Identification of activity area signatures in a reconstructed Iron Age house by combining element and lipid analyses of sediments*, Journal of Archaeological Science, 2009, 36, 174–183.

[72] M.C.Fuentes Álvarez, *Modificación del perfil de ácidos grasos de la leche a través de la manipulación nutricional en vacas lecheras: el papel del rumen*, Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, 2009.

[73] M.P.Colombini, *Characterisation of organic residues in pottery vessels of the Roman age from Antinoe (Egypt)*, Microchemical Journal, 2005, 79, 83– 90.