

PROPUESTA DE PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA CON XRF

M. POLO CERDA

E. CASAS CANET

J. D. VILLALAÍN BLANCO

Lab. de Antropología Forense y Paleopatología

Unidad Docente de Medicina Legal

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Valencia

INTRODUCCIÓN

El análisis cuantitativo del contenido de oligoelementos o elementos traza (ET) en el hueso humano es una técnica de uso paleoantropológico que permite caracterizar la economía alimentaria de poblaciones humanas y está basada en el fraccionamiento trófico (herbívoros, omnívoros, carnívoros y hombre) que sufren determinados elementos (Ca, Sr, Ba, Zn, Cu, entre otros) (AUFDERHEIDE, 1989; LAMBERT *et al.*, 1984).

Para esta cuantificación de ET, los diferentes investigadores han empleado múltiples metodologías: espectrofotometría de rayos X, espectrofotometría de absorción atómica (A.A.S.), espectrofotometría de emisión atómica (ICP/AES), espectrofotometría de masas por inducción de plasma acoplado (ICP/MS), espectrofotometría de fluorescencia de rayos X (XRF), entre otras.

La espectrofotometría de rayos X fue de las primeras técnicas empleadas en estudios de paleodietas durante la década de los 50. Sin embargo, la A.A.S ha sido el método más empleado y citado en estos estudios durante las últimas dos décadas. Actualmente, nuevas variantes de la primera (XRF) ofrecen, *a priori*, posibilidades de investigación paleonutricional y toxicológica muy interesantes.

La XRF todavía es una técnica muy poco empleada en estudios de paleodieta, pero sí utilizada en otras áreas de la Arqueología como en la caracterización química de cerámicas (CLAUSELL *et al.*, 1998) y monedas. Con XRF, AHLGREN *et al.* (1981) cuantificaron niveles de Pb y Ba en poblaciones romanas; LAMBERT *et al.* (1983) la emplearon asociada a una microsonda electrónica con fines diagenéticos (citado por CECCANTI, 1994), y SAFONT (1992) (citado por MALGOSA y SUBIRA, 1997), para cuantificar ET con finalidad paleonutricional.

OBJETIVOS

Los objetivos que nos planteamos con este trabajo son dos:

1. Proponemos un protocolo de análisis de ET con XRF para investigación paleonutricional y toxicológica en restos óseos arqueológicos previo estudio diagenético mediante ultrasonidos (US).
2. Se exponen los resultados obtenidos del análisis diagenético con US+XRF, así como resultados de cuantificación de tóxicos (Pb) y ET (Sr, Zn, Ca) en poblaciones de época romana, neolítica y medieval, respectivamente.

MATERIAL

Los análisis se han llevado a cabo sobre muestras de hueso procedentes de tres yacimientos de diferentes épocas:

Época neolítica (IV milenio a.C.):

- Yacimiento Villanueva de la Fuente (Ciudad Real). Representación: 7H/2He/1T.
- 7 humanos (adultos jóvenes), 2 herbívoros y 1 de tierra.

Época romana (siglos I a.C.-II d.C.):

- Yacimiento Villa Romana (Vall de Uixó, Castellón). Representación: 3H/2He/1T.
- 3 humanos (adultos), 2 herbívoros y 1 de tierra.

Época medieval (siglo XV):

- Ermita de la Magdalena (Castellón). Representación: 1H/2C/1He/1P/1M/1T.
- 1 humano (subadulto), 2 carnívoros, 1 herbívoro, 1 pez, 1 molusco y 1 de tierra.

PROTOCOLO

El protocolo empleado en nuestras investigaciones, y el que se propone, se detalla a continuación (Figura 1):

1. Extracción de una **muestra** de tejido óseo compacto donde la acción tafonómica haya actuado en menor cuantía.
2. Posterior **lavado** con agua milliQ y se introduce en un vaso de precipitados con agua desionizada (milliQ).
3. Aplicación de **baños de ultrasonidos** durante 15 minutos, y cada 5 minutos se cambia el agua del vaso, conservándose el agua residual para análisis cualitativo.
4. **Desecación** de la muestra en estufa a 125 °C durante 5 minutos.
5. **Fragmentación** de la muestra en un mortero de ágata.
6. **Pesada inicial** de la muestra.
7. **Calcinación** a 850 °C durante 45 minutos (véase en el apartado de Metodología).
8. **Enfriamiento** en desecador durante 10 minutos.
9. **Pesada final** de la muestra, para cuantificar pérdida de materia orgánica a la acción del fuego.

Este punto permite no solo conocer el grado de pérdida de materia orgánica, sino que indirectamente proporciona datos aproximados relativos a la datación.
10. **Pulverización** del hueso en el mortero de ágata. Otra opción: prensado en pastilla o fundición en una perla de bórax.
11. **Lectura:** Espectrofotómetro de XRF. Sobre cantidad de polvo, pastilla o perla.

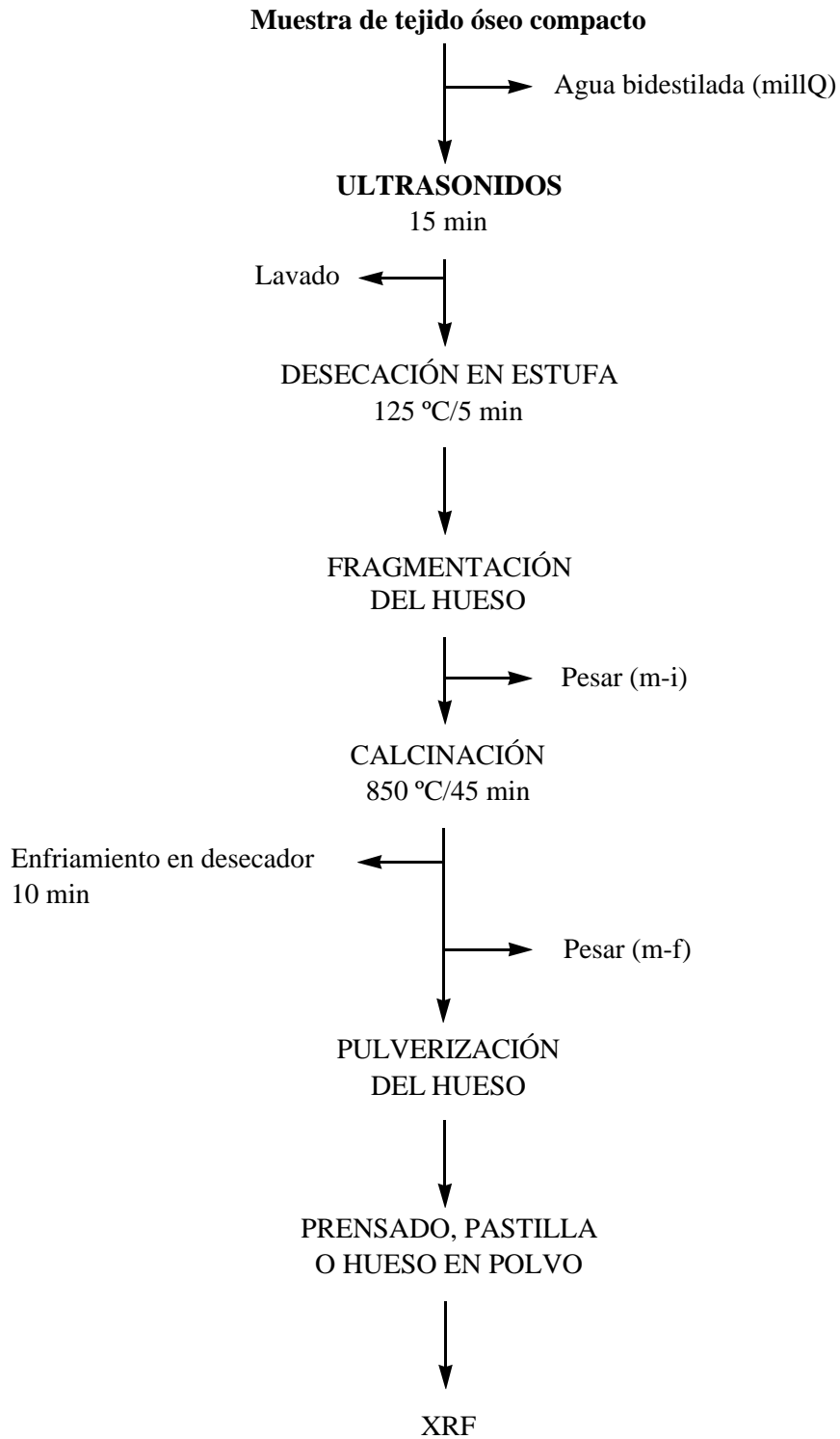


Figura 1. Protocolo de tratamiento químico para análisis de elementos traza con XRF.

METODOLOGÍA

Respecto a la metodología empleada, a continuación se hace especial hincapié en la importancia del empleo de ultrasonidos para la valoración diagenética, se revisan algunos aspectos en relación a la cremación de las muestras y se hace una introducción al análisis químico con XRF.

Valoración diagenética:

La valoración diagenética se suele llevar a cabo mediante métodos de limpieza mecánica o química (PRICE, 1992). Nosotros proponemos la aplicación de un método físico no descrito hasta el momento: el baño de ultrasonidos.

El principio de la limpieza por ultrasonidos consiste en la utilización de las ondas sonoras de alta frecuencia (40 KHz) que se propagan mecánicamente en el interior de la cuba, produciendo un efecto cavitación que origina la formación de millones de burbujas microscópicas de baja presión que ejercen una limpieza molecular. En las muestras óseas este efecto inocuo de cavitación penetra en cualquier parte donde la solución limpiadora (agua milliQ) esté en contacto con la superficie del hueso, mejorando ostensiblemente el método de limpieza mecánica o química.

El empleo de baños de ultrasonidos permite eliminar las trazas contaminantes, como queda de manifiesto macroscópicamente y mediante análisis cualitativo con XRF de una batería de cuatro elementos (Ca, Sr, Zn, Ba) respecto a las muestras en las que no se ha empleado dicho método.

Efecto de la cremación:

El efecto de la cremación del hueso proporciona resultados cuantitativos ligeramente diferentes con respecto al hueso no incinerado en relación a ciertos elementos. Respecto a ET discriminadores de dieta, como Sr, Zn, Cu, Ba, Mg y Ca, la incineración parece no influir (GRUPE y HUMMEL, 1991; SUBIRA y MALGOSA, 1993).

Para análisis con XRF y muestras en polvo es conveniente homogeneizarlas mediante incineración.

Análisis mediante XRF:

La técnica empleada ha sido la espectrofotometría de fluorescencia de rayos X (XRF), gracias a la infraestructura del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (S.C.S.I.E.) de la Universidad de Valencia.

La XRF es una técnica de análisis cuyo método consiste en irradiar una sustancia (en este caso, una cantidad de hueso pulverizado) con un haz de rayos X a una adecuada energía, y *a posteriori*, con un espectrofotómetro, analizar las longitudes de onda de las radiaciones características excitadas de los elementos presentes en la sustancia (Figura 2). El método tiene la ventaja de no ser destructivo en comparación con la A.A.S.

El aparato empleado ha sido el modelo PW 2400 Philips, que lleva acoplado el software Super Q Manager con dos posibilidades analíticas (SemIQ): cuantitativa (empleada para el estudio de paleodieta) y cualitativa-semicuantitativa (empleada para el estudio diagenético).

Bases físico-químicas de la fluorescencia de rayos X:

Cuando se produce la transición electrónica de un estado de nivel de energía superior inestable a otro inferior más estable se origina la emisión de fotones. Este fenómeno de transición electrónica, acompañado de una emisión radiactiva de poca duración, se denomina fluorescencia.

Cuando irradiamos un determinado material con fotones de alta energía (rayos X), los átomos que forman dicho material expulsan parte de sus electrones en forma de fotoelectrones. La pérdida de éstos origina una inestabilidad iónica, por lo que los electrones de orbitales más externos

pasan a los huecos que se han producido en orbitales internos, originándose lo que se denomina una transición electrónica. Esta transición viene acompañada de la liberación de fotones de alta energía denominados fotones de rayos X secundarios.

Mediante el uso de la técnica de fluorescencia de rayos X pueden hacerse análisis de tipo cualitativo y cuantitativo de elementos traza. El análisis cualitativo se explica a través de la ecuación de Moseley, donde la inversa de la longitud de onda de la radiación característica de una determinada línea espectral es directamente proporcional al cuadrado del número atómico de elemento en cuestión ($1/\lambda^2$). Por comparación de la medida de la longitud de onda de dicha radiación emitida por los átomos de la muestra problema con los valores tabulados en bibliografía se determinan los posibles elementos. En la actualidad todos estos valores están incluidos dentro del software del equipo.

La determinación cuantitativa de cada elemento es posible mediante relaciones de proporcionalidad entre intensidad de la señal emitida y concentración del elemento. Esto es posible construyendo curvas de calibrado de intensidad de la señal en función de la concentración del elemento.

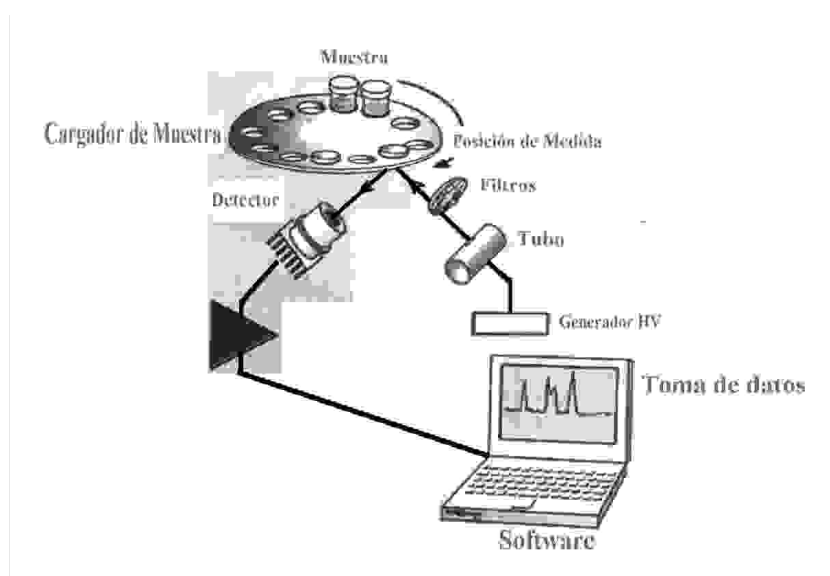


Figura 2. Diagrama que representa las partes del equipo de XRF.

RESULTADOS

Estudio diagenético:

La aplicación de US permite valorar cualitativamente el grado de contaminación del hueso por ET procedentes de las tierras del yacimiento.

Las muestras de hueso sometidas a US presentan menores porcentajes de Ca, Sr, Zn y Ba respecto a las muestras en las que no se aplicó US (véase un ejemplo en Tabla 1).

Macroscópicamente, las muestras sometidas a US presentan una textura "limpia", a diferencia de las que no se aplicó US, que contienen gran cantidad de contaminantes (tierra) (Figura 3).

Tabla 1. Valoración diagenética con baños de ultrasonidos.

Muestra con ultrasonidos		Muestra sin ultrasonidos	
Kcps	%	Kcps	%
Ca 359,635	73,824	Ca 0347,741	97,55
Sr 3,042	0,101	Sr 2,990	0,194
Zn 0,442	0,053	Zn 0,538	0,124
Ba 0,072	0,104	Ba 0,104	0,292

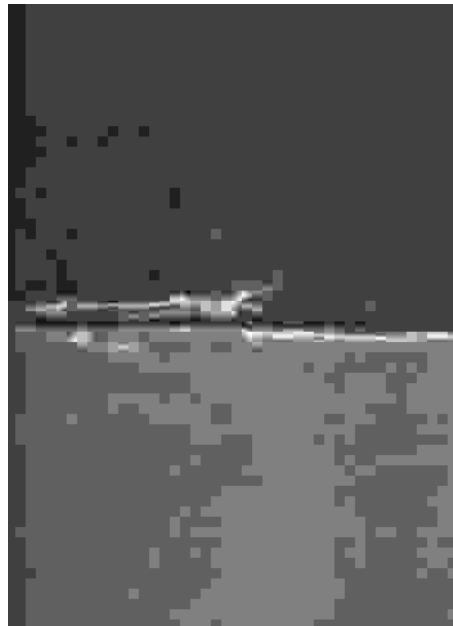


Figura 3. Muestra sin US (imagen superior) y muestra con US (imagen inferior).

Resultados obtenidos en los estudios toxicológicos y de paleodietas:

a) Estudios toxicológicos:

El empleo del plomo en época romana en utensilios varios y en la distribución de las canalizaciones de aguas es un hecho incuestionable. El estudio de elementos traza ha permitido cuantificar niveles de Pb en hueso de diferentes colecciones óseas (WALDRON *et al.*, 1976, citado por MALGOSA y SUBIRA, 1997).

Así ,por ejemplo, AHLGREN y cols. (1981), empleando XRF, encuentran concentraciones de 10 m/g en esqueletos de época romana procedentes del Roman-British cementery de Cirencester (Inglaterra).

Nosotros, mediante la metodología anteriormente desarrollada, hemos encontrado niveles de Pb (Figura 4) en tres esqueletos de época romana (siglos I a.C-II d.C) procedentes del yacimiento de Villa Romana de Vall de Uxó (Castellón). La media de estas concentraciones es de 1.4 m/g (POLO, CASAS. y VILLALAÍN, 1999).

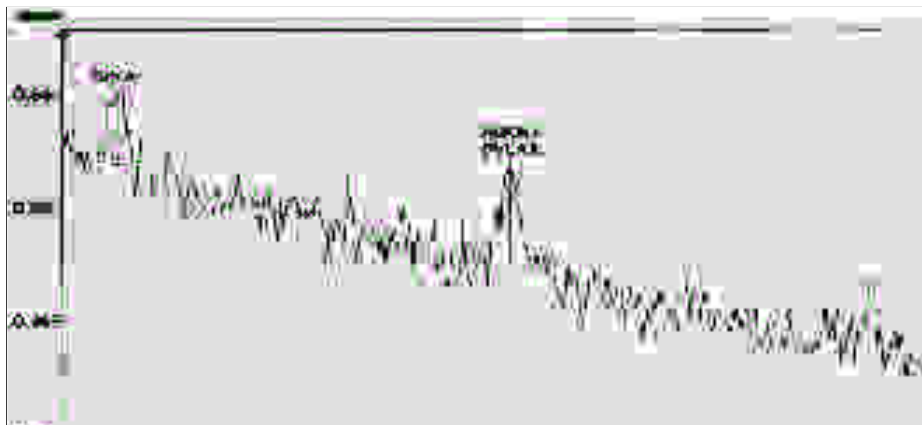


Figura 4. Espectro de fluorescencia del Pb en los restos óseos de Villa Romana (siglos I a.C.-II d.C.; Vall de Uxó, Castellón).

b) *Estudios de paleodieta:*

Los estudios de paleodieta se han llevado a cabo en las poblaciones ya descritas, si bien en la población romana de Vall de Uxó todavía están en preparación. Se han cuantificado niveles de Ca, Sr y Zn. Los resultados obtenidos para las muestras humanas de la población neolítica de Villanueva de la Fuente (Ciudad Real) (POLO *et al.*, 1999) son los siguientes:

- Ca (mg/g) = 358,67 (DS 4,7), Sr (ppm) = 157,28 (DS 37,1) y Zn (ppm) = 142,62 (DS 58,3).

La interpretación de dichos resultados se ha hecho siguiendo el sistema establecido por FORNACIARI y MALLEGNI (1987), que clasifica el patrón alimentario o económico de las poblaciones humanas en base a la concentración de Zn y Sr en hueso respecto al Ca. Estos autores establecen unos valores límite del índice Sr/Ca (corregido) = Sr/Ca humano/Sr/Ca herbívoro (O.R., *observed ratio*) y del índice Zn/Ca para clasificar la dieta de un grupo humano (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles Sr/Ca y Zn/Ca para la clasificación de la economía alimentaria (tomado de FORNACIARI y MALLEGNI, 1987).

Patrón de dieta	O.R.	Patrón de ingesta cárnica	Zn/Ca
Agrícola (vegetariano)	> 0,7	Rica (carne y leche)	> 0,5
Mixta (vegetales, leche, carne)	0,4-0,7	Media (vegetales, leche, carne)	0,35-0,5
Pastoril (leche, carne)	< 0,4	Baja (vegetales)	< 0,35

Los resultados obtenidos para ambos índices son: Sr/Ca(c) = Sr/Ca humano/Sr/Ca *Oryctola - gus cuniculus* = 0,843 (O.R., *observed ratio*) y Zn/Ca = 0,397.

Siguiendo la interpretación propuesta por los autores mencionados, el índice Sr/Ca sugiere un tipo de alimentación agrícola vegetariana, con un aporte de proteínas de origen animal medio.

Por otra parte, en el esqueleto de época medieval (siglo XV) hallado en la ermita de la Magdalena de Castellón (MIQUEL, POLO y VILLALAIN, 1999), el índice Sr/Ca(c) es del orden de 0,48, y el Zn/Ca, del orden de 0,318; luego sugiere una dieta mixta con aporte bajo de ingesta de carne.

CONCLUSIONES

1. Los ultrasonidos son un buen método de limpieza de las muestras que permite amortiguar el efecto diagenético.
2. El protocolo propuesto para el análisis de oligoelementos mediante XRF es válido para caracterizar la economía alimentaria de una población, así como para poder determinar intoxicaciones por tóxicos minerales; por ejemplo, el Pb.
3. La espectrofotometría de XRF es un método que tiene la ventaja de ser más rápido en análisis que la A.A.S. Requiere de un tratamiento químico de la muestra sencillo, pero económicamente es más caro; de ahí que sólo se pueda acceder a esta metodología en centros de investigación dotados de gran infraestructura.

BIBLIOGRAFÍA

- AHLGREN, L., CHRISTOFFERSSON, J.O. y MATTSSON, S. 1981. Lead and barium in archaeological Roman skeletons measured by nondestructive X-ray fluorescence analysis. En D.J. Smith, C.S. Barret, D.L. Leyden y P.K. Predecki (eds.). *Plenum. Advances in X-Ray Analysis*, 24: 377-382. New York.
- AUFDERHEIDE, A.C. 1989. Chemical analysis of skeletal remains. En Alan R. Liss. *Reconstruction of life from the skeleton*. 237-260.
- CECCANTI, B. 1994. Alterazioni diagenetiche dei reperti ossei nel terreno. En F. Mallegni e M. Rubini (coord.). *CISU. Recupero dei materiali scheletrici umani in Archeologia*, 193-222. Roma.
- CLAUSELL, G.; FERNÁNDEZ, F.; JORDÁN, M.M. y SANFELIU, T. 1998. Estudio arqueométrico de cerámicas arqueológicas del Torrelló del Boverot (Almassora, Castellón). *La Murà. Revista del Museo Municipal de Almassora*. 43-89.
- FORNACIARI, G. y MALLEGNI, F. 1987. Paleonutritional studies on skeletal remains of ancient populations from the Mediterranean area: An attempt to interpretation. *Anthrop. Anz.*, 45 (4): 361-370. Stuttgart.
- GRUPE, G. y HUMMEL, S. 1991. Trace element studies on experimentally cremated bone I. Alteration of the chemical composition at high temperatures. *Journal of Archaeological Science*, 18: 177-186.
- LAMBERT, J.B.; SIMPSON, S.V.; SZPUNAR, C.B. y BUIKSTRA, J.E. 1984. Ancient human diet from inorganic analysis of bone. *Acc.Chem. Res.*, 17: 298-305.
- MALGOSA, A. y SUBIRÀ, M.E. 1997. Estudio de paleodietas a través de los elementos traza. Metodología, limitaciones y aportaciones a la paleopatología. En M.M. Macías y J.E. Picazo (ed.). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz. *La enfermedad en los restos humanos arqueológicos. Actualización conceptual y metodológica*, 109-123. Cádiz.
- MIQUEL, M.J.; POLO, M. y VILLALAÍN, J.D.. 1999. Estudio bioantropológico de los restos óseos hallados en la ermita de la Magdalena, Castellón. *Actas del XXV Congreso Nacional de Arqueología*, 620-625. Valencia.
- POLO, M.; NEGRE, M.C.; MIQUEL, M.J.; GIL, P. y VILLALAÍN, J.D. 1999 a. Estudio paleodontológico y paleonutricional de los restos óseos del yacimiento neolítico de Villanueva de la Fuente (Ciudad Real). *Actas del II Congreso del Neolítico en la Península Ibérica*. Valencia (en prensa).
- POLO, M., CASAS, E. y VILLALAÍN, J.D. 1999 b. *Estudio paleonutricional de los restos humanos del yacimiento Villa Romana (Vall de Uxó)* (en preparación).
- PRICE, T.D.; BLITZ, J.; BURTON, J. y EZZO, J.A. 1992. Diagenesis in Prehistoric bone: Problems and solutions. *Journal of Archaeological Science*, 19:513-529.
- SUBIRA, M.E. y SAFONT, S. 1996. Recomendaciones para el uso de los elementos traza en antropología. *Boletín de la Asociación Española de Paleopatología*, 8:9-12.
- SUBIRÀ, M.E. y MALGOSA, A. 1993. The effect of cremation on the study of trace elements. *International Journal of Osteoarchaeology*, 3: 115-118.

