

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**Analysis of biomarkers for the biogenic characterization and farming practices identification of prehistoric organic sediments from rock-shelters and caves used as livestock-pens**

**Caracterización biogénica e identificación de prácticas pastoriles mediante el análisis de biomarcadores en sedimentos orgánicos prehistóricos procedentes de abrigo refugio y cuevas redil**

This Doctoral Thesis has been carried out in the Department of Analytical Chemistry at the University of the Basque Country, UPV/EHU

(Faculty of Pharmacy, Vitoria-Gasteiz)

Jaime Gea Del Río

2020



Las razones que me llevaron a realizar este trabajo fueron en origen fruto de la casualidad y de una desafortunada enfermedad que me obligo a apartarme de una vida mas o menos encauzada que tenía hasta entonces, un proyecto en el que me embarqué con una gran ilusión con el objeto de ampliar mis conocimientos científicos y recuperar inquietudes que no experimentaba desde que finalicé mis estudios superiores en el 2003. Han pasado unos cuantos años desde entonces y tras varios imprevistos y baches por el camino puedo decir que estoy a punto de terminar este trabajo.

En primer lugar agradecer al Prof. Ramón Barrio y a la prof. Arantxa Goicolea, así como a todo su equipo por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, poniendo a mi disposición los medios necesarios para la realización de este trabajo.

La presente tesis Doctoral se ha llevado a cabo con la participación y colaboración de tres grupos de investigación, el primero de ellos, el High Yeild Group of Prehistory (IT 622-13) dirigido por el prof. Fernandez Eraso del Dpto. de Geografía, Prehistoria y Arqueología de la UPV/EHU, el grupo MetaboloMIPs (IT338-10) dirigido por el Prof. Ramón Barrio del Departamento de Química Analítica de la UPV/EHU y el Grupo: Subsistence, Technology and Human Evolution, (2017 SGR 1040) dirigido por el Prof. Josep Maria Vergès, así mismo, dentro de las colaboraciones formativas, hay que destacar la estancia pre-doctoral en la Universidad de Pisa (Departamento de Química y Química Industrial) bajo la supervisión del Prof. Maurizio Persico y la Prof. Erika Ribechini.

Me gustaría agradecer a mis directores, Ramón y Asier por la paciencia que ha tenido conmigo, los conocimientos y valores que me han transmitido, así como el apoyo recibido en los momentos difíciles.

I wish to express my sincere thanks to Prof. Erika Ribechin, for giving me a chance to be part of her group and helping me in my difficult health moments during my stance in Pisa.

### *Agradecimientos/Acknowledgements*

---

A los técnicos del Servicio Central de Análisis de Álava, Mamen y Ali que desinteresadamente me ha apoyado en todo momento en todas las dificultades que me han ido surgiendo a lo largo de todo este trabajo, así mismo, por su paciencia, consejos y ánimos cuando los resultados no eran los esperados o cuando había que repetir un ensayo.

A todos los compañeros del Departamento de Química Analítica Zuri, Alexis, Laura, Dei, Raquel, Nagore, Jon, y Sandra por acogerme como un miembro más del grupo y al resto de los profesores del departamento Nora, Alberto y Maitane.

Muy especialmente a mi compañera Jaione, el amor de mi vida, que siempre está ahí para lo que sea, incondicional y que me ha ayudado a enfrentarme a todas las dificultades que me han ido surgiendo en todos estos años, a su paciencia que es infinita y su cariño.

Por último, a mi familia, mis padres Blanca, José Antonio y mis dos hermanas Laura y Ainhoa por estar siempre ahí y como no, a mi familia política, mi suegra Isa, todos ellos que junto a mi amor son los pilares fundamentales de mi vida.







---

**TABLA DE CONTENIDOS**

<b>LISTA DE ACRÓNIMOS/ LIST OF ACRONYMS</b> .....	IX
<b>RESUMEN/SUMMARY</b> .....	XV

**CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

---

<b>1.1 DOMESTICACIÓN ANIMAL</b> .....	3
<b>1.2 ACTIVIDAD PASTORIL EN CUEVAS Y ABRIGOS REFUGIO</b> .....	4
<b>1.2.1 La Sierra de Cantabria</b> .....	8
<b>1.2.2 La Sierra de Atapuerca</b> .....	9
<b>1.3 BIOMARCADORES COMO HERRAMIENTA PARA CARACTERIZAR EL ORIGEN ANIMAL DE LOS FUMIERS</b> .....	11
<b>1.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA</b> .....	22
<b>1.4.1 Muestreo</b> .....	22
<b>1.4.2 Homogeneización y extracción de muestras</b> .....	23
<b>1.4.3 Saponificación e hidrólisis ácida</b> .....	29
<b>1.4.4 Limpieza</b> .....	29
<b>1.4.5 Análisis mediante la utilización de espectrometría de masas</b> .....	30
<i>1.4.5.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</i> .....	30
<i>1.4.5.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas</i> .....	32
<b>1.4.6. Análisis de lignocelulosas</b> .....	32
<i>1.4.6.1 Pirolisis</i> .....	33
<i>1.4.6.2 PY-GC-MS</i> .....	34
<i>1.4.6.3 EGA-MS</i> .....	36
<b>1.5 PROCESADO Y ANÁLISIS DE DATOS</b> .....	37
<b>1.6 BIBLIOGRAFIA</b> .....	41

---

**CHAPTER 2: OBJETIVES**

---

<b>2.1 OBJETIVES</b> .....	63
----------------------------	----

---

**CHAPTER 3: CHARACTERIZATION OF ANCIENT LIPIDS IN  
PREHISTORIC ORGANIC RESIDUES: A CHEMICAL EVIDENCE OF LIVE-  
STOCK-PENS IN ROCK-SHELTERS SINCE EARLY NEOLITHIC TO  
BRONZE AGE**

---

<b>3.1 INTRODUCTION</b> .....	67
<b>3.2 EXPERIMENTAL</b> .....	70
<b>3.2.1 Chemical, reagents and reference standards</b> .....	70
<b>3.2.2 Sampling and sample storage</b> .....	71
<b>3.2.3 Microwave assisted extraction</b> .....	72
<b>3.2.4 Saponification step</b> .....	73
<b>3.2.5 Liquid-liquid extraction, clean-up and derivatization step</b> .....	73
<b>3.2.6 Instrumental analysis</b> .....	73
<b>3.3 RESULT AND DISCUSION</b> .....	74
<b>3.3.1 Optimization of the clean-up step</b> .....	74
<b>3.3.2 Optimization of the microwave assisted extraction</b> .....	75
<b>3.3.3 Quality parameters of the developed method</b> .....	82
<b>3.3.4 Application to real samples from San Cristobal site and biogenic         characterization of the samples</b> .....	84
<b>3.4 CONCLUSIONS</b> .....	93
<b>3.5 BIBLIOGRAPHY</b> .....	94

---

**CHAPTER 4: COMBINED QUANTIFICATION OF SEX HORMONES, BILE ACIDS AND STEROLS IN FUMIER SAMPLES FROM LOS HUSOS I AND LOS HUSOS II**

---

<b>4.1 INTRODUCTION</b> .....	103
<b>4.2 MATERIALS AND METHODS</b> .....	106
<b>4.2.1 Chemical</b> .....	106
<b>4.2.2 Sampling and storage</b> .....	107
<b>4.2.3 Ultrasonic bath extraction</b> .....	108
<b>4.2.4 Saponification step</b> .....	108
<b>4.2.5 Liquid-liquid extraction</b> .....	108
<b>4.2.6 LC-MS analysis</b> .....	109
<b>4.3 RESULTS AND DISCUSION</b> .....	110
<b>4.3.1 Optimization of the sonication time and extraction efficiency</b> .....	110
<b>4.3.2 Methodology quality assurance parameters</b> .....	111
<i>4.3.2.1 Calibration curves correlation coefficient and stability</i> .....	111
<i>4.3.2.2 Study of the matrix effect</i> .....	114
<i>4.3.2.3 Calculation of detection and quantification limits</i> .....	114
<b>4.3.3 Analysis of the archaeological samples</b> .....	115
<i>4.3.3.1 Source identification</i> .....	115
<i>4.3.3.2 Hormone analysis</i> .....	124
<b>4.4 CONCLUSIONS</b> .....	128
<b>4.5 BIBLIOGRAPHY</b> .....	129

---

**CAPITULO 5: CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS DE LA CUEVA DE EL MIRADOR**

---

<b>5.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>135</b>
<b>5.2 MUESTREO, ALMACENAMIENTO Y HOMOGENEIZACIÓN DE LA MUESTRA.....</b>	<b>138</b>
<b>5.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS ARQUEOLÓGICAS POR MEDIO DE MW-LC-MS.....</b>	<b>140</b>
<b>5.3.1 Reactivos y disolventes.....</b>	<b>140</b>
<b>5.3.2 Extracción asistida por microondas (MAE).....</b>	<b>140</b>
<b>5.3.3 Saponificación.....</b>	<b>141</b>
<b>5.3.4 Extracción líquido-líquido.....</b>	<b>141</b>
<b>5.3.5 Análisis instrumental LC-APCI-MS.....</b>	<b>142</b>
<b>5.3.6 Parámetros de calidad del método.....</b>	<b>143</b>
5.3.6.1 <i>Calibración del método.....</i>	143
5.3.6.2 <i>Estudio del efecto matriz.....</i>	144
5.3.6.3 <i>Recuperación del método para concentraciones altas y bajas.....</i>	145
5.3.6.4 <i>Cálculo de los límites de detección y cuantificación.....</i>	145
<b>5.3.7 Análisis de las muestras reales .....</b>	<b>146</b>
5.3.7.1 <i>Identificación biogénica de las muestras.....</i>	146
5.3.7.2 <i>Identificación de práctica pastoriles de las muestras.....</i>	160
<b>5.3.8 Conclusiones.....</b>	<b>163</b>
<b>5.4 CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS ARQUEOLÓGICAS POR PY-GC-MS.....</b>	<b>165</b>
<b>5.4.1 Muestreo.....</b>	<b>165</b>
<b>5.4.2 Instrumentación.....</b>	<b>165</b>
<b>5.4.3 Resultados.....</b>	<b>166</b>
5.4.3.1 <i>Estudio quimiométrico en muestras reales.....</i>	168
<b>5.4.4 Conclusiones.....</b>	<b>170</b>
<b>5.5 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>171</b>

---

**TEMA 6: ANÁLISIS DE RESTOS ACTUALES Y CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS ARQUEOLÓGICAS MEDIANTE TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS**

---

<b>6.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>177</b>
<b>6.2 MUESTREO.....</b>	<b>177</b>
<b>6.2.1 Muestreo de muestras con origen fumier.....</b>	<b>177</b>
<b>6.2.2 Muestreo de muestras de heces actuales.....</b>	<b>178</b>
<b>6.3 ANÁLISIS DE LAS HECES ACTUALES.....</b>	<b>179</b>
<b>6.3.1 Determinación de la concentración de esteroides, fitoesteroides y ácidos biliar.....</b>	<b>179</b>
<b>6.3.2 Determinación de la concentración de n-alcános.....</b>	<b>194</b>
6.3.2.1 <i>Reactivos y materiales.....</i>	194
6.3.2.2 <i>Extracción líquido-líquido (LLE).....</i>	195
6.3.2.3 <i>Instrumentación GC-MS.....</i>	195
6.3.2.4 <i>Parámetros de calidad.....</i>	196
6.3.2.4.1 <i>Calibración del método.....</i>	196
6.3.2.4.2 <i>Cálculo del límite de detección y cuantificación .....</i>	196
6.3.2.4.3 <i>Recup. del método a concentraciones bajas y altas .....</i>	196
<b>6.4 ANÁLISIS EN MUESTRAS REALES.....</b>	<b>197</b>
<b>6.5 COMBINACIÓN Y SELECCIÓN DE N-ALCANOS, ESTEROLES Y ÁCIDOS BILIARES PARA UNA MEJOR CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS ACTUALES Y ARQUEOLÓGICAS.....</b>	<b>199</b>
<b>6.6 RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....</b>	<b>205</b>
<b>6.7 CONCLUSIONES.....</b>	<b>208</b>
<b>6.8 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>209</b>

---

**TEMA 7: GENERAL CONCLUSIONS**

---

<b>7.1 GENERAL CONCLUSIONS.....</b>	<b>215</b>
-------------------------------------	------------

**ANEXOS**

---

<b>ANEXO I. ANÁLISIS MEDIANTE DRX DE MUESTRAS PROCEDENTES DEL YACIMIENTO ARQUEOLÓGICO DE ATAPUERCA (CUEVA DE EL MIRADOR).....</b>	<b>I</b>
<b>ANEXO II METODOLOGÍA ANALÍTICA.....</b>	<b>II</b>
<b>ANEXO III RESULTADOS.....</b>	<b>III</b>
<b>ANEXO IV DIFRACTOGRAMAS DE LAS DIFERENTES MUESTRAS.....</b>	<b>IV</b>







Lista de acrónimos/ List of acronyms

AD	Después de Cristo/ after Christ
AG	Ácido graso/ fatty acid
APCI	Ionización química a alta presión/ atmospheric pressure ionization
ASE	<i>Extracción acelerada de solventes/accelerated solvent extraction</i>
BC	Antes de Cristo/ before Christ
BP	Antes del presente/ before present
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida/ <i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
Camp	Campesterol/ campesterol
Cheno	Ácido chenodeoxicólico/ chonodeoxicholic acid
CHOL	Colesterol/ cholesterol
Col	Colestanol/ Cholestanol
DCM	Diclorometano/ dichloromethane
Deox	Ácido deoxicólico/ Deoxicholic acid
E1	Estrona/ estrone
E2	17 $\beta$ -estradiol/ 17 $\beta$ -estradiol
E3	Estriol/ estriol

EGA-MS	Análisis por gas de envolvimiento- espectrometría de masas / involved gas analysis- mass sepctrometry
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas/ <i>enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EpiCop	Epicoprostanol/ epicoprostanol
ESI	Ionización por electrospray/ electrospray ionization
EtOAc	Acetato de etilo/ ethyl acetate
FAME	Ácido graso metil ester/ fatty acid methyl ester
FID	Detector de ionización de llama/ flame ionization detector
GC	Cromatografía de gases-gas chromatography
GC-MS	Cromatografía de gases/ gas chromatography-mass spectrometry
HCl	Ácido clorhídrico/ Chlorhydric acid
HDMS	1,1,1,3,3,3-Hexametildisilazano/ hexamethyldisilazane
<i>HMDS</i>	<i>Hexametildisilazano</i>
IT	Trampa de iones/ ion trap
KOH	Hidróxido potásico/ potassium hidroxide
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas/ liquid chromatography-mass spectrometry
Lit	Ácido litocólico/ lithocholic acid
LLE	Extracción líquido-líquido/ liquid-liquid extraction
LOD	Límite de detección/ limit of detection

LOQ	Límite de cuantificación/ limit of quantification
m/z	Ratio de masa carga/ mass to charge ratio
MAE	Extracción asistida por microondas/microwave assisted extraction
MeOH	Metanol/ methanol
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida/ <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
MVA	Análisis multivariante estadístico/ <i>multivariate statistical analysis</i>
NaOH	Hidróxido sódico/ sodium hydroxide
PCA	<i>Análisis del componente principal/ principal component analysis</i>
PCs	Componente principal/ principal components
PG	Progesterona/ progesterone
PLE	Extracción líquida a alta presión/ <i>pressure liquid extraction</i>
PY	Pirolisis/ pyrolysis
<i>PY-GC-MS</i>	Pirolisis-cromatografía de gases- espectrometría de masas/ pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry
qMS	Cuadrupolo espectrometría de masas/ cuadrupolo espectrometría de masas
QQQ	Triple cuadrupolo/ tripe quadropole
QTOF	Cuadrupolo tiempo de vuelo/ quadropole time of flight
RP-HPLC	Fase reversa-cromatografía líquida de alta resolución/ reversed phase- high performance liquid chromatography.

RSD	Relative standard deviation/ desviación estandar relativa
SIM	Monitorización del ión seleccionado/ Selected ion monitoring
SIMCA	Método de reconocimiento de modelos/ <i>soft independent modelling by class analogy</i>
Sit	$\beta$ -sitosterol/ $\beta$ -sitosterol
SPE	Extracción en fase sólida/ solid phase extraction
Stigtanol	Estigmastanol/ Stigmastanol
Stigterol	Estigmasterol/ Stigmasterol
TG	Trigliceridos/ trygliceride
TG	Termogravimetría/ thermogravimetry
TLE	Extracción de lípidos totales/ total lipid extraction
TMS	Tetrametilsilano/ tetramethylsilane
TOF	Tiempo de vuelo/ time of flight
TT	Testosterona/ testosterone
Urso	Ácido ursodeoxicólico/ ursodeoxicholic acid
USE	Extracción asistida por ultrasonidos/ultrasound assisted extraction,







One of the main challenges of Archaeology is to find scientific methods that allow drawing conclusions about the nature of material remains, their age and geographical (temporary and spatial) location and their relationship with different human activities, their culture and their behaviors. Additionally, Analytical Chemistry, as a science that provides answers to the knowledge of the composition of matter in space and time, enables us to obtain reliable data from which validated conclusions can be obtained by researchers from other areas. The collaboration between scientists in the fields of Archaeology and Analytical Chemistry has made it possible to solve problems that have been discussed since immemorial time and has opened up an enormous field of possibilities for the interpretation and/or reinterpretation of historical facts.

Among the human activities with the greatest historical impact, the beginning of animal domestication should certainly be highlighted. Any scientific knowledge that can provide reliable information about the beginning, development, nature and geographical location of this human activity will become of crucial importance in shaping the historical account. The archaeological findings about early farming brings with it an exciting analytical challenge. This way, answers to many unknowns questions could be possible by means of targeted samplings and the development of new methodologies.

The present research uses sophisticated analytical techniques to detect the presence of farming biomarkers. A significant part of this archaeological study is based on the analysis and quantification of the different farming biomarkers in archaeological sediments, which allows the unequivocal identification of the different human activities given over the History.

A biomarker or a biological marker is a substance used as an indicator of a biological state. It must be measurable and evaluable as an indicator of a normal biological process, pathogenic state or response to drug treatment. This concept is commonly used in Health field but it can be extended to other areas, being understood as the substance or groups of substances of human, animal or vegetal origin, which characterize a certain human activities, its presence or its temporal situation. Archaeological biomarkers must possess one more chemical characteristic: they must be atoms or molecules that persist over time or, at least, show a standard uniform pattern of degradation. In the case of organic molecules, this condition is difficult to maintain. In consequence, the preservation conditions of archaeological sites and the matrices or materials in which these substances are sought should be carefully studied. The sampling procedure becomes crucial, to avoid any undesired contamination that may affect the analytical results.

The measurement of biomarkers must be implemented using analytical techniques that provide reliability and, in most cases, high sensitivity. It should be taken into consideration that biomarker molecules are usually found at low concentration levels and,

in many cases, at trace levels. That way, mass spectrometry combined with chromatographic separation techniques is currently a guarantee for the identification and unequivocal quantification of organic substances and it is necessary to have deuterated standards of the substances under analysis, which allow working with isotope dilution techniques to eliminate any matrix effect. This is not always practicable, both for economic reasons and because of the availability of these standards on the market.

On the other hand, once the analytical problem is solved, it will be necessary to organize and treat the large volume of data obtained. This would not be possible without the use of chemometric techniques that allow visualizing and providing the maximum information through the mathematical and statistical analysis of the chemical data.

In the present doctoral thesis, special emphasis has been placed on determining shepherds practices and the biogenic origin of the animals sheltered over time in mountain rock- shelters or caves located in the Sierra de Cantabria and the Sierra de Atapuerca, respectively and certified by archaeological excavations carried out between 1964 and 2020. For that aim, new analytical methods have been developed based on microwave or ultrasonic extraction and gas or liquid chromatography coupled to mass spectrometry analysis. Those methods have been used to detect specific biomarkers of each animal species, quantify them and predict biogenic origin of the samples using already known equation.

On the other hand, nowadays animal feces (sheep, goat, cow, horse, deer, bison, wild pig) has been collected and a classification model has been carried out in order to classify those archaeological samples unable to classify using already known equation. In the same way, pyrolysis-gas chromatography mass spectrometry or direct pyrolysis mass spectrometry techniques has been used to distinguish faces of different origin.

All this collaborative research endeavor has been accomplished with the participation of three investigation groups, which have contributed with their experience and knowledge to carry out the study that is being presented. The initial studies began due to the interest of Proffesor Fernández Eraso from the Department of Geography, Prehistory and Archaeology of the UPV/EHU and his High Yield Research Group of Prehistory (IT 622-13), which opened up the possibility of establishing a line of investigation that would make it possible to associate the nature of stabled animals with the presence of certain organic substances in the strata excavated from the rock shelters located in the Sierra Cantabria. The results of this first contact with the MetaboloMIPs group (IT338-10) of the Department of Analytical Chemistry of the UPV/EHU are the first results of this Thesis. Subsequently, a relationship was established with Dr. Josep Maria Vergès of the Catalan Institute of Human Paleoecology and Social Evolution (IPHES) (Group: Subsistence, Technology and Human Evolution, 2017 SGR 1040),

responsible for the excavation of the Mirador in the Sierra de Atapuerca. The results of this collaboration constitute the second part of the Thesis.

Finally, it should be pointed out the formative collaborations that have taken place during this time and especially the period of pre-doctoral stay at the University of Pisa, in the Department of Chemistry and Industrial Chemistry which, under the supervision of Professor Maurizio Persico and Professor Erika Ribechini, allowed the development of analytical methods for the analysis of lignins found in the above-mentioned excavations.





---

## Capitulo 1. Introducción



## 1.1 DOMESTICACIÓN ANIMAL

La domesticación animal se considera uno de los eventos más significativos ocurridos en el devenir histórico de la humanidad, ya que fue el responsable de generar una transformación en los modos de vida, suponiendo el tránsito de una economía de subsistencia a otra de producción. Desde entonces, el ser humano no se ha servido únicamente de los recursos que le proporcionaba el entorno, sino que él mismo se encargó de generar nuevos recursos y alimentos. En dicho proceso de cambio se produce una intromisión del ser humano en el desarrollo de los ciclos naturales, entre los que destacan la tala de bosques para la extensión de cultivos, el aniquilamiento de las especies tóxicas y peligrosas o la paulatina y constante humanización del entorno. Todo este conjunto de cambios constituye la huella que el ser humano ha provocado en el constante desarrollo de las civilizaciones<sup>1</sup>.

El proceso de domesticación viene precedido de una relación simbiótica previa entre el ser humano y ese animal o planta que termina con el control, protección y uso de dicho animal o planta<sup>2</sup>. Este modelo explica todos y cada uno de los procesos de domesticación llevados a cabo por el ser humano. El precedente más antiguo de domesticación animal del que se tiene referencia es el del perro (*Canis Lupus*). Ésta se produjo hace unos 11.000 años y el perro se utilizó como animal de compañía que facilitaba las labores de caza. Otro animal, el gato (*Felis silvestris*), que también hacían labores de mascota, se domesticó en Chipre para evitar la proliferación de ratas<sup>3</sup> hace también 11.000 años. Cinco siglos más tarde, hace unos 10.500-10.000 años, en el oeste de Eurasia, fueron domesticadas las cabras (*Capra aegagrus*), ovejas (*Ovis orientalis*) y vacas (*Bos primigenius*). En un principio, tanto la cabra como la oveja eran utilizadas en exclusiva como fuente de alimentación. Debido a la caza intensiva y la sobreexplotación de estas dos especies, el ser humano se vio obligado a realizar un cambio de estrategia. Con la domesticación, el ser humano logró controlar estos animales, y por consiguiente, ampliar los recursos obtenidos de ellos y pasar de ser una fuente exclusiva de aporte proteico a través de su carne, a ser también fuente de leche y lana<sup>3</sup>. La domesticación continuó con el control de otras especies como el jabalí (*Sus scrofa*), los bisontes (*Bison bison*), las

gallinas (*Gallus gallus*), los camellos (*Camelus dromedarius*) y las llamas (*Lama glama*). En la Figura 1.1 se representa la cronología de la evolución de las especies domesticadas.

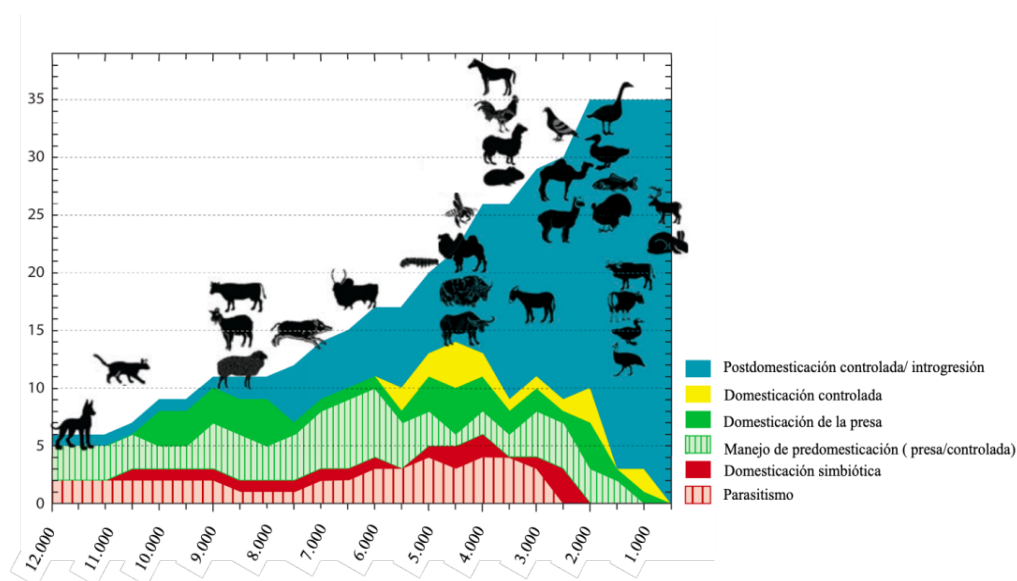


Figura 1.1. Cronología de la domesticación animal<sup>3</sup>

## 1.2 ACTIVIDAD PASTORIL EN CUEVAS Y ABRIGOS REFUGIO

El desarrollo y proliferación de la domesticación obligó a los pastores a buscar refugio para sus reses y mantenerlas a salvo. El uso de cuevas o abrigos refugio como establos fue una práctica habitual en las zonas mediterráneas desde el Neolítico a la Edad de Hierro<sup>4-6</sup>. El principal rasgo común de los yacimientos encontrados en dichos refugios son sus características sedimentológicas, que se presentan como espacios con depósitos de apariencia arcillosa originados por grandes cantidades de estiércol generado por presencia continuada de ganado, principalmente ovicaprino. Los animales estabulados provocan el incremento de los residuos del establo, constituidos por la acumulación del estiércol junto con productos aportados por ellos mismos, hierbas, tierra y piedras. En función del tiempo de uso y del número de cabezas de ganado, los residuos alcanzan mayor o menor espesor<sup>7</sup>. Todo este conjunto de residuos producto de la actividad pastoril son los que conforman a la postre los episodios de estabulación.



Con el objeto de mantener limpio y libre de parásitos el establo, frecuentemente se reducía el volumen de estiércol mediante su quema, siendo una práctica que se estima que duró hasta la Edad de Bronce, ya que a partir de entonces, en un importante número de yacimientos, se documentan acumulaciones reelaboradas de estiércol pero sin quemar<sup>8</sup>.

La quema continuada de este estiércol a lo largo de los años ocasiona depósitos que están constituidos por diferentes capas o facies de sedimentos, generadas por la sucesión de unidades combustionadas o no combustionadas, que son denominadas de forma genérica como *fumier* (estiércol en francés)<sup>7</sup>.

En todas las excavaciones realizadas, los *fumier* muestran unas características generales:

- ✓ Están formados por largas y complejas sucesiones de capas finas o muy finas, normalmente horizontales que pueden aparecer abovedadas. Aunque normalmente estas capas se encuentran bien separadas, las terminaciones abruptas y cambios laterales entre facies son frecuentes.
- ✓ Los *fumiers* suelen estar organizados en alteraciones de capas no quemadas, parcialmente quemadas y totalmente quemadas (de abajo arriba) que forman facies claramente reconocibles en el campo. La conjunción de estas tres capas forman lo que se puede considerar un episodio de estabulación completo y la acumulación de varios episodios proporcionarían un ciclo de estabulación<sup>9</sup>. Los ciclos de estabulación no son homogéneos sino que su composición y grosor estará en relación directa con la duración de cada uno de los episodios de estabulación, con el tipo de ganado que se encierra y con el número de cabezas que producen el residuo<sup>9</sup>.
- ✓ Las facies de los *fumiers* poseen una policromía muy característica dependiendo de su alteración. Esta varía con matices en los diferentes yacimientos, que de forma general se podría describir de la siguiente manera (de abajo arriba): En la base de las capas se advierte siempre una superficie de tonalidad rojiza/marrón oscura, formada por tierra rubefactada, correspondiente a excrementos sin quemar. Sobre ella, una capa negra, dqqaze combustión parcial correspondiente materia orgánica

carbonizada y finalmente sobre todas ellas una capa gris o blanca (cenizas) correspondiente a la combustión total de los excrementos junto ramas y hojas (Figura 1.2). Dependiendo de la humedad, las corrientes de aire y el grado de degradación del estiércol, este puede combustionar a rangos de temperatura comprendidos entre 450 °C y 800 °C<sup>10</sup>. Estos rangos de temperatura de combustión corresponden a los que se somete a la capa totalmente calcinada de color blanca (cenizas), ya que en la capa negra la temperatura a la que llega es mucho menor. Finalmente, la capa de color marrón rica en compuestos orgánicos es la que apenas ha sufrido impacto térmico<sup>10</sup>.

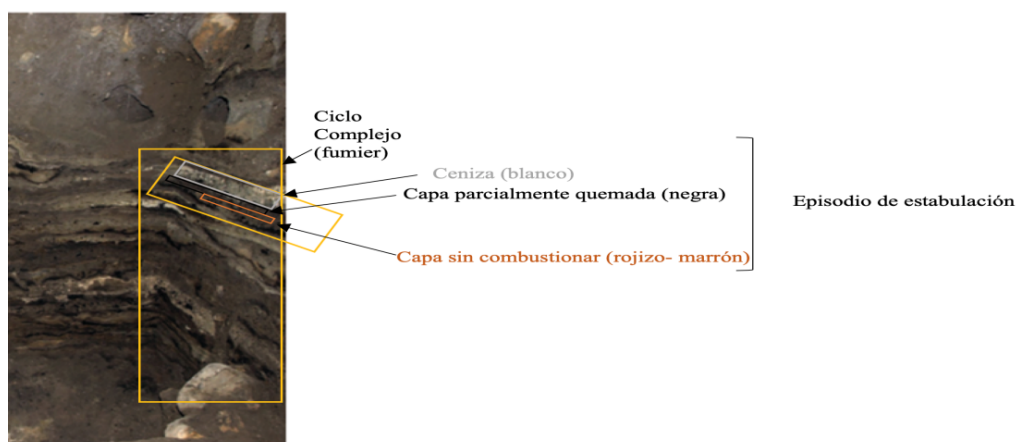


Figura 1.2. Ilustración de un episodio de combustión<sup>7</sup>

Esta estrategia de eliminación de excremento animal se lleva a cabo en las zonas mediterráneas (Figura 1.3), donde los yacimientos más destacados que presentan *fumiers* son:

- En el noroeste de la península ibérica: Cova del Pardo y Cova de Guineu<sup>11,12</sup>; Can Sadurní<sup>13</sup>; Santa Maira, Bulumini y Cova de les Cendres<sup>14,15</sup> Cinto Mariano<sup>16</sup>; Abric de la Falguera<sup>17</sup>; Cova Colomera<sup>18</sup> y Balma de la Margineda<sup>19,20</sup>.
- En el norte de la península Ibérica: San Cristóbal, Los Husos I y II<sup>7,21,22</sup> y El Mirador<sup>23,24</sup>.
- En el sureste de Francia: Fontjuvenal<sup>25</sup>; Grotte Antonnaire<sup>26</sup>; Caune de Bélesta<sup>27</sup>;

Grotte du Gardon<sup>28</sup>; y otras<sup>29</sup>.

- En la región de Liguria en Italia: Arene Candide<sup>30-32</sup>.
- En la región peri-Adriática oriental: diferentes cuevas en el Trieste Karst<sup>33</sup>; Pupíeina peć<sup>34</sup>; Vaganačka pećina<sup>35</sup> y otros<sup>34</sup> en Croacia; la cueva Konispol en Albania<sup>36</sup>.
- En la región peri-Adriática occidental: grotta dei Piccioni y Grotta Sant' Angelo en Abruzzo<sup>37</sup>; Grotta delle Mura en Apulia.
- Y en la región Alpina: Egołzwil 3<sup>38,39</sup>; Albon Bleiche 3<sup>40</sup>; La Grande Rivoire<sup>41</sup>; Ripara Gaban<sup>42,43</sup>.



**Figura 1.3.** Localización de los distintos yacimientos donde se ha detectado fumiers<sup>5</sup>. 1: Cinto Mariano; 2: Abric de la Falguera; 3: Cova del Parco; 4: Cova de la Guineu; 5: Can Sadurní; 6: Santa Maira; 7: Bolumini; 8: Cova de les Cendres; 9: Cova Colomera; 10: Balma de la Margineda; 11: Los Husos I y II, San Cristobal y Peña Larga; 12: El Mirador; 13: Fontjuvental; 14: Caune de BeÀL lesta; 15: Grotte Antonnaire; 16: Grotte du Gardon; 17: La Grande Rivoire; 18: Arene Candide; 19: Trieste Karst; 20: PupicÀLina pecÀL ; 21: Vagana\_cka pecÀLina; 22: Konispolcave; 23: Grotta Sant'Angelo; 24: Grotta dei Piccioni; 25: Grotta delle Mura; 26: Egołzwil 3; 27: Arbon Bleiche 3; 28: Riparo Gaban

Algunos de los yacimientos arriba mencionados se encuentran en dos sierras situadas en la zona norte de la Península Ibérica, en la Sierra de Cantabria (11-Los Husos

I y Husos II, Peña Larga, San Cristóbal, Araba/Álava) y en la Sierra de Atapuerca (12-El Mirador, Burgos). Por su localización, su estado de conservación y por las relaciones establecidas con los investigadores responsables de las excavaciones, estos yacimientos presentan las características óptimas para iniciar un estudio como el que se pretende con el presente trabajo.

### **1.2.1 La Sierra de Cantabria**

Sobre la zona meridional del Territorio de Araba/Álava (País Vasco, España) se emplaza La Sierra de Cantabria o Sierra de Toloño. Se trata de una formación de calizas cretácicas que coronan un farallón rocoso en la zona más elevada, disponiéndose sobre formaciones conglomeradas terciarias, compuestas por cantos areniscos con una mala cimentación caliza<sup>44</sup>. La formación de la sierra se produce por causa del cabalgamiento surpirenaico, que es el mayor de los accidentes tectónicos que se observan en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Marca el límite entre la cuenca vasco-cántabra y la cuenca del Ebro y por su emplazamiento señala el paso del Medio al Alto Valle del Ebro y supone el cierre de la depresión del Ebro por el norte<sup>7</sup>.

La sierra presenta una serie de oquedades en las que se ha observado actividad humana durante la Prehistoria Reciente. Estos sitios se asientan sobre formas conglomeradas, como son los casos de Peña Larga término municipal de Cripán, Rioja Alavesa, (coordenadas geográficas, (4260387, -2.549566), de Los Husos I y II municipio de El Villar, Rioja Alavesa, (42603816, -2.549422), o sobre formaciones calizas, en las que se localizan los abrigos de San Cristóbal o el de Peña Parda, municipio de Laguardia, Rioja Alavesa, (4259945, -2.625684)<sup>45</sup>.

Todos ellos se orientan bien al sur o hacia el sol naciente. El lugar en el que se emplazan en la sierra no llega a superar los 1000 metros de altura, siendo el de Peña Larga el que se encuentra en la zona más elevada y los de Los Husos los más próximos a las cotas del valle<sup>45</sup> (Figura 1.4).

Desde todos ellos, salvo el de San Cristóbal, se domina el paisaje abierto de la Rioja Alavesa, hasta la vecina Sierra de Cameros<sup>45</sup>.



**Figura 1.4.** Localización de los yacimientos con actividad pastoril: 1) San Cristóbal; 2) Peña Parda; 3) Peña Larga; 4) Los Husos I y II<sup>45</sup>.

### 1.2.2 La Sierra de Atapuerca

La Sierra de Atapuerca se puede considerar como un conjunto montañoso que se extiende de noreste a sudeste, entre los sistemas montañosos de la cordillera Cantábrica y el sistema Ibérico en la provincia de Burgos. Geológicamente está conformado por un relleno de calcáreas, dolomitas y calcarenitas del Cretácico superior<sup>46</sup>. Las formaciones más recientes corresponden a conglomerados calcáreos y arcillas del Oligoceno. Constituida por fenómenos endo y exokársticos formados por proceso de relleno pertenecientes al Pleistoceno Inferior<sup>47</sup>. La ubicación de la sierra en el ecotono del corredor de La Bureba han favorecido su ocupación por las poblaciones humanas, ya desde el Pleistoceno inferior<sup>48</sup>.

La existencia de rellenos cuaternarios en los karsts de la sierra fue documentada ya a mediados del siglo XIX<sup>49</sup>. Sin embargo, las intervenciones sistemáticas no comienzan hasta la década de los 60 del siglo XX de la mano de Emiliano Aguirre<sup>50</sup>. En la sierra de Atapuerca destacan los yacimientos de Trinchera del Ferrocarril, Cueva Mayor, Cueva de El Mirador y zona exterior de Karst<sup>51</sup>. La trinchera del Ferrocarril es una zanja artificial realizada para el trazado del tren minero y donde destacan los yacimientos de la Sima del Elefante, la Gran Dolina y la Galería<sup>51</sup>. En el complejo Cueva Mayor destacan los yacimientos de los Huesos y El Portalón donde se encuentra el refugio de El

Mirador<sup>51</sup>. Finalmente, en la zona exterior de Karst destacan los yacimientos al aire libre de Valle de las Camelias, Fuentemudarra, El Hundidero y Hotel California<sup>51</sup>. Dentro de todas ellas destaca la Cueva de El Mirador como cueva redil utilizada desde el Neolítico hasta el siglo XX<sup>51</sup>. La cueva de El Mirador se sitúa en las coordenadas geográficas (842.351061, -3.519587) y a una altura de 1033 m, pertenece al término municipal de Ibeas de Juarros, Burgos. La cavidad es de origen cárstico y presenta una morfología de abrigo generada por el hundimiento de una buena parte de su bóveda. En esta cueva, orientada hacia el sur, existen evidencias de actividad pastoril.



**Figura 1.5.** Localización del yacimiento con actividad pastoril en la Sierra de Atapuerca.

La presencia de *fumiers* en tan alto número de yacimientos se explica, fundamentalmente, por dos razones;

i) su durabilidad a lo largo del tiempo, debido a su localización de difícil acceso y la protección que implica frente a las inclemencias

ii) que se trata de un material no producido directamente por el ser humano, pero sí relacionado con la actividad del pastoreo, que utilizaba las cuevas y abrigos redil como lugar para resguardar al ganado, ovicápridos en sus origen, y que con posterioridad incorporó al ganado bovino<sup>52</sup>.

La buena conservación de estos sedimentos ha hecho posible estudios botánicos, micromorfológicos, geológicos, líticos y zoológicos que han permitido entender el comienzo y desarrollo pastoril en la Europa mediterránea<sup>4,24,45,53,54</sup>. Sin embargo, aun hoy, existen interrogantes, como el tipo de animal (oveja y/o cabra) que se estabulaba en lugares donde no se encuentran restos óseos y que aún hoy no es posible responder con el tipo de estudios realizados. Es por ello, que una nueva y útil herramienta en la determinación de las especies estabuladas es la búsqueda de biomarcadores de especies, que debido a la buena conservación de los episodios de quema puede no se hayan degradado y hayan perdurado a lo largo del tiempo.

### **1.3 BIOMARCADORES COMO HERRAMIENTA PARA CARACTERIZAR EL ORIGEN ANIMAL DE LOS *FUMIERS***

Desde el punto de vista arqueológico, se tiene un conocimiento preciso de la estructura, morfología y la formación del *fumier* a lo largo del tiempo<sup>10,24,55-57</sup>. Sin embargo, cuando no hay existencia de restos óseos, la determinación de la especie animal estabulada no es sencilla. El análisis de la materia orgánica presente en los *fumiers*, puede utilizarse para buscar biomarcadores fecales que ayuden a determinar la especie animal estabulada en cada episodio. Aunque el concepto de biomarcador en Arqueología se ha estado utilizando desde los años 80, no fué hasta 2008 cuando Evershed lo definió como “cualquier residuo orgánico que proporciona información relativa a actividades humanas en el pasado”<sup>58</sup>. Sin embargo, esta definición ha ido evolucionando a lo largo de tiempo en paralelo con los avances científicos en el campo de la Arqueología, llegando a nuestros días bajo el término de biomolécula arqueológica<sup>59,60</sup>. Esta última definición incluye diferentes moléculas como el ADN, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos. Las nuevas investigaciones en Arqueología siguen centrando su atención en los lípidos (esteroles, ácidos biliares y los ácidos grasos) debido, por un lado, a la información valiosa que aportan, y por otro, a la estabilidad química y capacidad de mantenerse en el lugar de origen, debida a su carácter hidrofóbico que impide la lixiviación en contacto con el agua<sup>58-63</sup>.

Existe una larga lista de publicaciones relacionadas con el estudio de diferentes biomarcadores utilizados en Arqueología, desde el estudio de *n*-alcanos (C<sub>23</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> y C<sub>31</sub>) para la caracterización de ceras de abeja en residuos orgánicos<sup>64</sup> y la reconstrucción paleoambiental<sup>65</sup>, hasta el estudio de esteroides para la caracterización de coprolitos humanos de 14.000 años de antigüedad<sup>66</sup>. En la Tabla 1.1 se presentan diferentes trabajos donde se especifica el biomarcador analizado, el material de estudio y la referencia bibliográfica.

**Tabla 1.1.** Biomarcadores arqueológicos en diferentes tipos de matrices

BIOMARCADORES	MATERIAL DE ESTUDIO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>n</i> -Alcanos (C <sub>23</sub> ; C <sub>25</sub> - C <sub>31</sub> )	Residuos orgánicos	McGovern, P.E 2004 <sup>64</sup>
Esteroides	Coprolitos humanos	Sistiaga, A 2014 <sup>66</sup>
<i>n</i> -Alcanos; esteroides; ácidos grasos; TG	Vasijas y recipientes contenedores.	Evershed 2008 <sup>58</sup>
<i>n</i> -Alcanos (C <sub>25</sub> - C <sub>31</sub> ), polen, lignina	Sedimentos antiguos	Fisher, E et al. 2003 <sup>65</sup>
Esteroides	Alcantarillado Romano de agua fecales.	Bull, I.D 2003 <sup>67</sup>
Esteroides, lípidos alifáticos	Fósiles	Bull, I.D 1999 <sup>68</sup>
Esteroides, ácidos biliares	Residuos fecales Alcantarillado Romano	Bull, I.D 2002 <sup>69</sup>
TG	Sedimentos antiguos	Saliu, F. 2014 <sup>70</sup>
Isótopos de carbono y oxígeno	Fósiles de homínidos	Ecker, M et al. 2013 <sup>71</sup>
<i>n</i> -Alcanos, TG, FAME, benceno, tolueno	Sarro dental Neanderthal	Hardy, K et al 2012 <sup>72</sup>
Esteroides	Coprolitos	Lin, D.S 2001 <sup>73</sup>
Esteroides, ácidos biliares	Baños públicos imperiales	Baeten, J et al. 2012 <sup>74</sup>
Isótopos de carbono y nitrógeno	Colágeno restos Neanderthal	Bocherens, H 2005 <sup>75</sup>
Ácido tartárico	Ánforas	Pecci, A. 2013 <sup>76</sup>
AG, ésteres	Restos arqueológicos	Martine Regert, 2003 <sup>77</sup>
Ergo lipit	Vasijas y recipientes cerámicos	Lucejko, J.J et al. 2018 <sup>78</sup>
Nicotina	Fragmentos en pipas de fumar	Tushingham, S. 2018 <sup>79</sup>
AG, triglicéridos	Recipientes aceite de ballena	Blanca-Zubiaguirre, L. 2018 <sup>80</sup>
Esteroides, ácidos biliares	Sedimentos arqueológicos	Zocatelli, R. et al. 2017 <sup>81</sup>
Compuestos volátiles orgánicos, polifenoles	Ánforas (mar adriático)	Jerković, I 2011 <sup>82</sup>

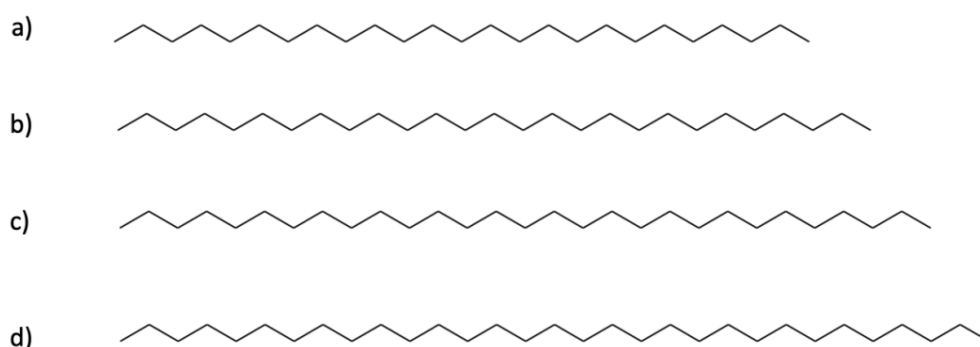
TG- Triglicéridos; AG-Ácidos grasos; FAME-Ácidos grasos metil ésteres.

La mayoría de los trabajos bibliográficos se centran en el estudio de biomarcadores de carácter hidrofóbico, entre los que destacan los *n*-alcanos, esteroides, ácidos biliares, ligninas y ácidos grasos.

- Los ***n*-alcanos** se han utilizado como biomarcadores para medir la actividad humana relacionada con prácticas agrícolas y ganaderas en el pasado mediante el estudio de sedimentos<sup>83</sup>. Son hidrocarburos de cadena larga que forman parte de la capa de cera de la superficie de las plantas y representan la primera barrera físico-química frente a



entorno ambiental exterior<sup>84</sup>, siendo los más representativos en función al número de carbonos los comprendidos entre C<sub>25</sub>-C<sub>35</sub>. La proporción y cantidad de *n*-alcanos depende de la especie de planta, pudiéndose identificar una determinada especie en función de la proporción de *n*-alcanos que presente<sup>84</sup>. Por otro lado, estos compuestos pueden usarse como biomarcadores en herbívoros debido a que son compuestos de difícil digestión y mediante su identificación en heces se puede conocer la proporción y el tipo de planta que se ha ingerido en la dieta<sup>85-87</sup>.



**Figura 1.6.** Representación de los *n*-alcanos, a) *n*-pentacosano (*n*-C<sub>25</sub>), b) *n*-heptacosano (*n*-C<sub>27</sub>), c) *n*-nonacosano (*n*-C<sub>29</sub>) y d) *n*-hentriacontano (*n*-C<sub>31</sub>).

- Los **esteroides** y los **ácidos biliares** se han empleado con éxito como biomarcadores para diferenciar y caracterizar heces de diferentes especies (humano, porcino, cánido, herbívoros y rumiantes)<sup>67,69</sup>. Dentro de los esteroides, los 5 $\beta$ -estanoles son los que tienen un verdadero valor como biomarcadores, dado que son productos de reducción del colesterol (CHOL) y fitoesteroides producidos en el tracto intestinal de la mayoría de los mamíferos (Figura 1.7). Su presencia, pueden ser muestra de la actividad animal en un espacio físico determinado o presencia de heces.

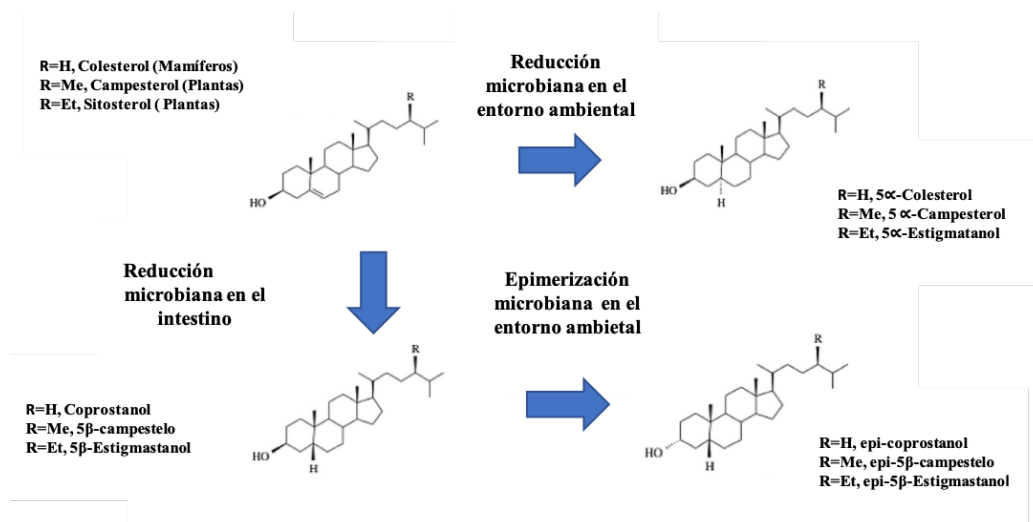
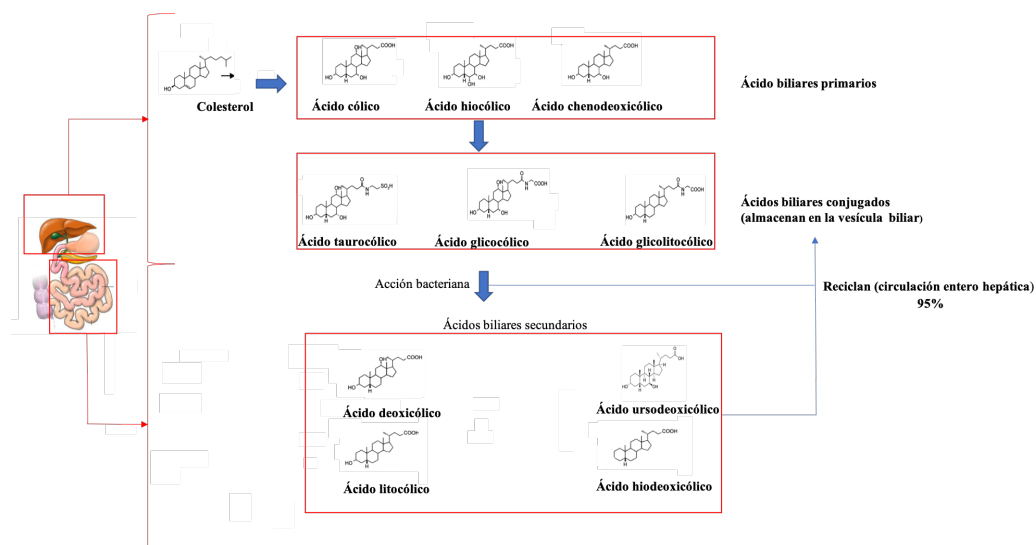


Figura 1.7. Reducción y epimerización microbiana del colesterol y fitosteroles<sup>69</sup>.

Otro tipo de esteroides que se observan en los residuos orgánicos de los yacimientos arqueológicos, son los fitosteroides. Estos esteroides de procedencia vegetal pueden ayudar a deducir la dieta de los habitantes de un yacimiento<sup>88</sup> o a determinar la actividad agraria de una determinada área o zona geográfica<sup>89</sup>. Por otro lado, los **ácidos biliares** son esteroides ácidos con grupos de C<sub>24</sub> a C<sub>28</sub> producidos por el aparato digestivo de los animales. Los ácidos biliares se dividen en dos grupos: los primarios que se sintetizan en el hígado a partir del CHOL (ácidos cólico, hiocólico y chenodeoxicólico (Cheno)) y los secundarios (ácido litocólico (Lit), deoxicólico (Deox), ursodeoxicólico (Urso), hiodoxicólico e isolitocólico), que se generan en el intestino de los mamíferos por acción de la flora microbiana sobre los ácidos biliares primarios<sup>69</sup> (figura 1.8). Los esteroides, los fitosteroides así como los ácidos biliares que son excretados, lo hacen en forma glucuronida, glucósida, sulfatada o taurinada para favorecer su eliminación del cuerpo animal o humano ya que al ser compuestos más polares aumentan su solubilidad en el agua<sup>90</sup>.



**Figura 1.8.** Formación de los ácidos biliares primarios y secundarios a partir del colesterol en el hígado y el intestino delgado<sup>69</sup>.

Los esteroides han sido utilizados con el objeto de caracterizar el origen animal de las muestras. La distribución de los esteroides en las heces de los vertebrados depende fundamentalmente de tres factores:

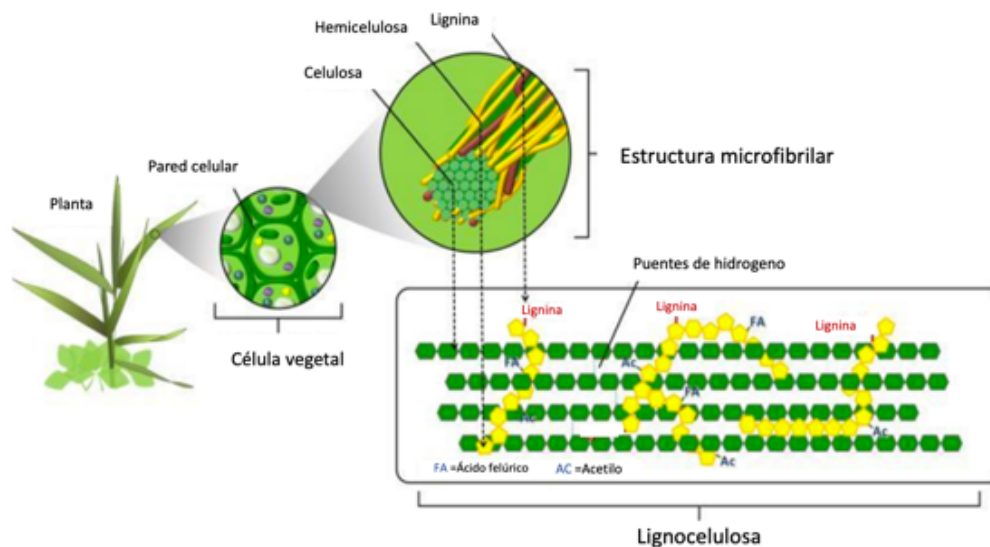
- 1) la dieta de los animales: diferentes dietas proporcionan diferentes concentraciones de los esteroides en las heces.<sup>91</sup>
- 2) la proporción endógena de esteroides es diferente en cada animal, lo que se traduce en diferentes concentraciones de esteroides en heces.
- 3) la transformación de los esteroides por la parte de la microbiota de cada animal puede producir diferentes configuraciones isoméricas de  $5\beta$ -esteroides en las heces<sup>92,93</sup>.

La combinación de estos tres factores puede ayudar a caracterizar las heces de diferentes tipos de animales. Así por ejemplo, las heces de los rumiantes presentan mayores concentraciones de fitoesteroides 29-C ( $\beta$ -sitosterol (Sit), campesterol (Camp) y estigmastanol (Stigtanol)), siendo el Stigtanol el más representativo<sup>94</sup>. Esto es debido a que evidentemente su dieta está constituida por hierbas. Por el contrario, las heces de los

omnívoros presentan mayores concentraciones de los esteroides 27-C (coprostanol (Cop), epicoprostanol (EpiCop) y colestanol (Col))<sup>95</sup>, siendo el Cop el mayoritario en humanos, cerdos y perros<sup>94</sup>. Esto es debido a su propia dieta, en combinación con la producción endógena y microbiota específica del animal.

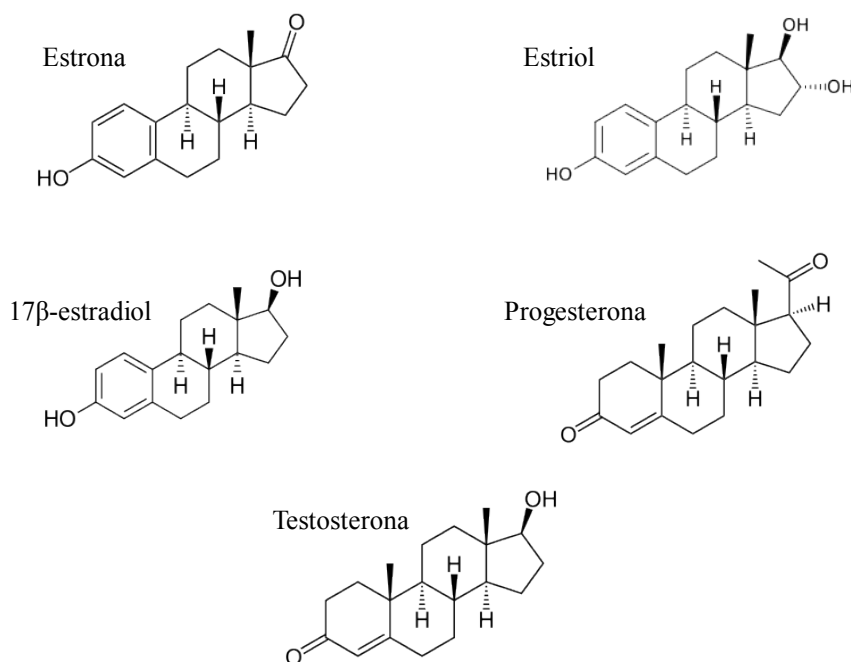
Los ácidos biliares son complementarios a los esteroides. Se atribuyen abundancias mayoritarias de deoxicólico a las heces de rumiantes, mientras que el litocólico a las heces de omnívoros. La presencia de hidroxicoólico y ursodeoxicólico están atribuidas a heces de cerdo<sup>67,69,96</sup>.

- Las **ligninas** se han utilizado con éxito como biomarcador para caracterizar el origen vegetal y el grado de degradación de la materia orgánica<sup>97-99</sup>. La lignina forma parte de una molécula más compleja, la lignocelulosa que es el compuesto renovable más importante generado por las plantas y que está formado a su vez por celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa es el componente mayoritario más abundante en la Tierra<sup>100</sup>, la hemicelulosa es el segundo y la lignina el tercero (Figura 1.9). Esta última está formada por tres tipos diferentes de alcoholes aromáticos (confenil, sinapil y p-coumaril), actuando como barrera de entrada frente a cualquier compuesto o enzima dentro de la estructura de la lignocelulosa y además, es el compuesto más resistente a la degradación<sup>101,102</sup>, aunque recientes estudios confirman que la estabilidad de estos compuestos y en concreto la lignina dependen de las interacciones biológicas y fisicoquímicas con el entorno circundante<sup>103,104</sup>.



**Figura 1.9.** Estructura, composición y procedencia de la lignocelulosa.

- Las **hormonas sexuales** están relacionadas con la actividad reproductiva de los mamíferos. Pueden considerarse como una alternativa para determinar el comportamiento y la actividad pastoril en la búsqueda de otros posibles marcadores y se han estado utilizando con frecuencia como biomarcadores en animales en cautividad para el control del ciclo reproductivo, pubertad y abortos<sup>105-107</sup>. Las hormonas como la estrona (E1), el  $17\beta$ -estradiol (E2), el estriol (E3) y la progesterona (PG) son características de las hembras siendo un buen indicador para confirmar embarazos y juega un papel fundamental en el ciclo menstrual y la formación y desarrollo del embrión<sup>108,109</sup> (Figura 1.10). Por el contrario, la testosterona (TT) es la principal hormona masculina y está relacionada con la dominación del grupo. Estas hormonas son excretadas por medio de la orina y las heces, con lo cual, se acumulan en el estiércol y podrían ser buenas marcadoras de la distribución de los animales estabulados por sexo y estado gestacional. Existen estudios, donde se han utilizado las heces (muestreo no invasivo) y el análisis de las hormonas para determinar el estado gestacional del animal<sup>107,110,111</sup>.



**Figura 1.10** Estructuras moleculares de la estrona, estriol, 17β-estradiol, progesterona y testosterona.

Con el objeto de caracterizar especies animales a través de sus heces, existen diferentes propuestas de algoritmos utilizados para determinar el origen biológico de la materia orgánica. En la Tabla 1.2 se muestran los más representativos y en ella puede observarse el biomarcador a analizar, la ecuación, el resultado de las relaciones, el origen de la materia orgánica y finalmente la referencia bibliográfica.

Como puede observarse estas ecuaciones pueden ser utilizadas para determinar la naturaleza animal de los animales asentados en los *fumiers*. No obstante existen todavía lagunas de conocimiento que no han permitido diferenciar entre determinadas especies de animales, como es el caso paradigmático de la oveja y la vaca <sup>96</sup>

**Tabla 1.2** Algoritmos para la identificación del origen biológico de la materia orgánica.

Ratio	Compues.	Ecuación	Resu. ratio	Origen M.O	Referencia
TAR <sub>HC</sub>	n-alcanos	$\frac{c_{27} + c_{29} + c_{31}}{c_{15} + c_{17} + c_{19}}$	TAR <sub>HC</sub> >4	Terrestre	Silliman, J.E 1996 <sup>112</sup>
			TAR <sub>HC</sub> <1	acuática	Ortiz, J.E. et al. 2013 <sup>113</sup>
P <sub>WAX</sub>	n-alcanos	$\frac{c_{25} + c_{27} + c_{29}}{c_{23} + c_{25} + c_{27} + c_{29}}$	P <sub>WAX</sub> >1	P. terrestre	Zheng, Y 2007 <sup>114</sup>
			P <sub>WAX</sub> <1	Macrofito	
K1	n-alcanos	$\frac{c_{27}}{c_{29}}$	$1 \geq K1 < 2$	Origen biogénico	Wang, Y.H. et al 2013 <sup>115</sup>
P <sub>LE</sub>	n-alcanos	$\frac{c_{25} + c_{27} + c_{29}}{c_{29} + c_{31}}$	P <sub>LE</sub> aumenta en función (t)	Actividad explotación forestal	D'Anjou, R.M. 2012 <sup>83</sup>
R1	Esteroles	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Colesterol}}$	R1>0,5	Heces	Nichols, P.D 1996 <sup>116</sup>
R2	Esteroles	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Colesterol}}$	R2>1	Humano	Quemeneur, M 1994 <sup>117</sup>
			R2>0,5		Fattore, E 1996 <sup>118</sup>
R3	Esteroles	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Coprostanol} + \text{Colestanol}}$	R3>0,7	Humano	Grimalt, J.O. 1990 <sup>119</sup>
			R3<0,3	No Humano	
R4	Esteroles	$\frac{\text{Coprostanol} + \text{Epicoprostanol}}{5\beta - \text{estigmastanol} + \text{Epi} - 5\beta - \text{estigmastanol}}$	R4>1	Humano, cerdo, perro	I.D Bull 2002 <sup>69</sup>
			R4<1	Rumiante	
R5	Esteroles	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Colesterol} + \text{Colestanol}}$	R5>0,06	Humano	Grimalt, J.O. 1990 <sup>119</sup>
R6	Esteroles	$\frac{\text{Epicoprostanol}}{\text{Coprostanol}}$	R6<0,2	Humano	Writer, J.H 1995 <sup>120</sup>
R7	Esteroles	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Epicoprostanol}}$	R7>1,5	Humano	Mudge, S.M 1999 <sup>121</sup>

Tabla 1.2 Continuación

Ratio	compuesto	Ecuación	Resultado ratio	Origen M.O	Referencia
R8	Esteroles	$\frac{\% \text{ Cop}}{\text{Esteroles totales}}$	R8>5-6%	Humano	Venkatesan, M.I 1989 <sup>122</sup>
R9	Esteroles	$\frac{\%24 - \text{EtilCop}}{\text{Esteroles totales}}$	R9>5-6%	Herbívoro	
R10	Esteroles	$\frac{\text{Camp} + \text{Sit}}{\text{CHOL}}$	R10>1,5	Porcino	Jardé,E 2007 <sup>123</sup>
			R10>2,5	Bovino	
R11	Esteroles	$\frac{\text{Cop} + \text{EpiCop}}{\text{CHOL}}$	R11<0,7	Bovino	
			R11>3,7	Porcino	
R12	Esteroles	$\frac{\text{Sit}}{\text{Cop}}$	2,3<R12<3,3	Bovino	Gourmelon, M et al. 2010 <sup>124</sup>
			0,2<R12<0,7	Porcino	
R13	Esteroles	$\frac{\text{Sit}}{\text{Sit} + \text{etilcop} + 24 - \text{etilepiCoP}}$	R13≥0,4	Ave	Devane, M.L et al. 2015 <sup>125</sup>
R14	Esteroles	$\frac{\text{Col}}{\text{Col} + \text{Cop} + \text{EpiCop}}$	R14≥0,5	Ave	



Tabla 1.2 Continuación

Ratio	Compuesto	Ecuación	Resultado ratio	Origen M.O	Referencia
R15	Esteroles	$\frac{\text{Cop} + \text{EpiCop}}{5\beta - \text{Stigtanol} + \text{Epi} - 5\beta - \text{Stigtanol}}$	R15<1	Rumiantes	Prost, K 2017 <sup>96</sup>
			R15>1	Omnívoros	
R16	Esteroles A.biliares	$\frac{\text{Cop}}{\text{Cop} + 5\beta - \text{Stigtanol}} \times 100$	R16<29%	Rumiante	
			(29%<R16<65%) +Urso	Porcino	
			R16<65%	Humano	
R17	Esteroles A.biliares	$\frac{\text{Epi} - 5\beta - \text{Stigtanol}}{5\beta - \text{Stigtanol}} + \frac{\text{EpiCop}}{\text{Cop}}$	Deox>Lit	Caballo	
			Cheno>Lit	Caballo	
			R19>1,2	Caballo	
			Deox ≈ Lit	Mono	
			Deox > Lit	Vaca y oveja	
			Deox >> Cheno	Cabra	
			Cheno≈ Lit	Cabra	
			Deox >> Lit	Cabra	
			Deox << Cheno	Ganso	
			Cheno > Lit	Ganso	
Deox < Lit	Ganso				
B1	A. biliares	$\frac{\text{A. Deoxicólico}}{\text{A. Litocólico}}$	B1>10	Herbívoro	Gea, J. et al. 2017 <sup>126</sup>

## 1.4 Metodología analítica

### 1.4.1 Muestreo

El muestreo constituye una etapa fundamental y crítica en todo el proceso de análisis. Dependiendo de las características del yacimiento se emplearán técnicas diferentes para proceder a la obtención de muestra, que no hay que olvidar que por su propia definición debe constituirse como una parte alícuota, que represente la totalidad de la superficie analizada. La realización del muestreo debe realizarse bajo la supervisión de los arqueólogos, que mediante la estratigrafía, es decir, el estudio de la colocación o deposición de estratos o niveles, son capaces de construir una secuencia relativa fiable de la deposición de los diferentes estratos, donde los más antiguos se encuentran abajo y los más modernos arriba. Con la utilización complementaria de técnicas cronológicas como el  $^{14}\text{C}$  se consigue una datación de cada uno de los estratos. Así mismo, es importante destacar que en el estudio del *fumier*, los propios sedimentos, estratos o niveles son la matriz de análisis de donde emana la información, siendo de vital importancia detectar también alteraciones humanas o naturales de los estratos posteriores a la deposición original, como pueden ser madrigueras realizadas por animales o basureros excavados, que pueden desvirtuar o modificar la secuencia estratigráfica original<sup>127</sup>.

El muestreo puede realizarse según dos procedimientos: a partir de una ciclo complejo o *fumier* cortado perpendicularmente al terreno<sup>4,7,22</sup>, o mediante la recogida de muestras de forma horizontal. El primero permite una visualización de los diferentes episodios de estabulación, facilitándose la datación de cada uno de ellos; por contra es una técnica que implica periodos largos de excavación que exponen a la zona de muestreo al contacto con el exterior, facilitándose procesos de oxidación que puedan alterar las muestras<sup>128</sup>. La cantidad de muestra que se puede obtener mediante este procedimiento es limitada (10-20 g), debido a que para su obtención se hace uso de un taladro que viene incorporado con un cilindro/corona hueco de 20 cm de largo por 1,5 cm de diámetro interior, lo que permite la obtención de muestras de 10 cm de profundidad horizontal de cada una de la facies de interés<sup>126</sup>. El segundo se realiza partiendo de bloques

rectangulares de donde se van recogiendo cada una de las facies con la ayuda de una pala de mortero. Esta técnica permite la obtención de mayor cantidad de muestra (30g a 1kg) y como el proceso se hace en el mismo día la exposición exterior es más corta en el tiempo evitándose las posibles degradaciones por oxidación.

Es importante destacar la importancia de la limpieza del material empleado para la extracción de muestra, al objeto de evitar la contaminación cruzada. Entre las tomas de muestra de cada una de las facies se procederá a la limpieza del material con metanol y agua desionizada, así como el uso de guantes desechables para evitar el contacto con las muestras

A continuación, las muestras son envueltas con una capa de aluminio para evitar el contacto con el plástico de las bolsas donde van a ser transportadas a 4°C y conservadas a -82°C hasta su análisis en el laboratorio.

#### **1.4.2 Homogeneización y extracción de muestras**

La preparación de la muestra es una etapa crítica en el procedimiento analítico general, ya que dependiendo de la efectividad del proceso pueden variar los resultados y como consecuencia la interpretación de los mismos. Por lo tanto, atendiendo a las características de los metabolitos que quieren estudiarse, la matriz en los que se encuentran, así como las condiciones físico-químicas de temperatura, presión, tiempo, pH y solubilidad que controlan el proceso, deben de elegirse los métodos de extracción más adecuados. Todo ello sin olvidar aspectos, que aunque no son estrictamente técnicos, sí que pueden afectar a la operatividad, desempeño o la ética del proceso, entre los que pueden resaltarse los criterios económicos y medioambientales.

Previo al proceso de homogenización, las muestras requieren de un proceso de secado que generalmente se realiza mediante la aplicación de un tratamiento térmico<sup>68</sup> o mediante técnicas como la liofilización. Este último método es apropiado cuando los metabolitos de estudio son termolábiles<sup>129</sup>. El secado es una etapa importante, ya que elimina la humedad de las muestras disminuyendo la posible hidrólisis de los analitos debido a la actividad biológica de la propia muestra. Se facilitan igualmente las etapas de

molienda y tamizado que buscan una completa homogeneización de las muestras, y consecuentemente la eliminación de piedras y partículas ajenas al *fumier* (donde no es esperable que se encuentren adsorbidas las moléculas objeto de análisis) y el aumento de la superficie de contacto entre las partículas y los disolventes de extracción<sup>126</sup>. Los biomarcadores fecales presentes en una muestra deben extraerse mediante procedimientos de extracción sólido-líquido como Soxhlet<sup>67,129-131</sup>, asistidas por ultrasonidos (*ultrasound assisted extraction*, USE)<sup>88,132,133</sup>, asistidas por microondas (*microwave assisted extraction*, MAE)<sup>126</sup> o aceleradas por alta presión (*pressure liquid extraction/accelerated solvent extraction*, PLE/ASE)<sup>96,134</sup>. Originariamente, la extracción mediante Soxhlet era la más generalizada a la hora de extraer esteroides de muestra de heces o suelo, sin embargo, sus largos tiempos de extracción (12-24h) y el uso de grandes cantidades de disolventes (150-250mL) originó el uso de otras técnicas de extracción más rápidas y más amables con el medio ambiente como son USE, MAE y PLE. En la Tabla 1.3 se resumen los tipos de muestra, analitos extraídos, los tipos de extracción, disolventes utilizados y método analítico empleado en la bibliografía.

Tabla 1.3 Revisión bibliográfica de las diferentes técnicas analíticas en biomarcadores fecales.

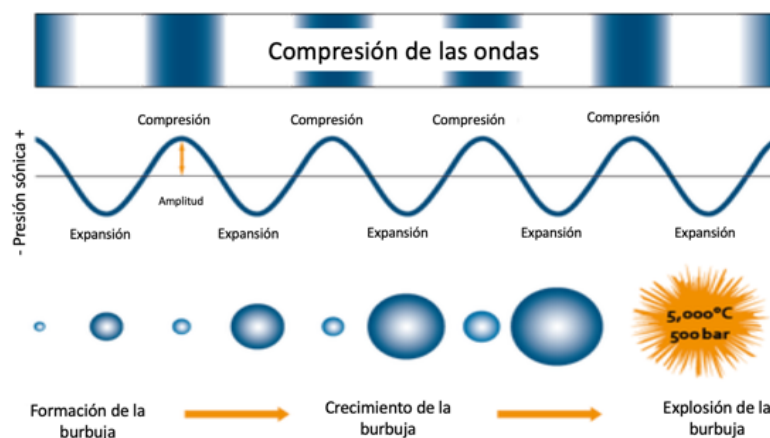
MUESTRA	CANTIDAD	ANALITOS	TÉCNICA DE EXTRACCIÓN Y DISOLVENTES	HIDRÓLISIS	DERIVATIZACIÓN	ANÁLISIS	REF
Sedimento/suelo	Inde.	Esteroles y ácidos biliares	Soxhlet (24h) DCM:MeOH (2:1,v/v)	Saponificación 5mL KOH(5M) 90% MeOH(1h,120°C), pH 3-4(HCl)	TMS (1h,70°C)	Análisis de esteroles y ácidos biliares por separado GC-MS y GC-FID	Bull, 2003 <sup>67</sup>
Suelo y sedimentos	5-10g	Esteroles y ácidos biliares	Soxhlet (36h)150mL DCM:MeOH (2:1,v/v)	Saponificación 3,5mL KOH(0,7M)90%MeOH(10-14h temperatura ambiente	Esteroles HMDS (1h,70°C) Ácidos biliares (1h, 80°C)	Análisis de esteroles y ácidos biliares por separado GC-MS	Birk, 2012 <sup>135</sup>
Muestras de heces	0,5-1g	Esteroles	Soxhlet (24h)200mL DCM:acetona (9:1,v/v)	Saponificación 5mL KOH(5M) 90% MeOH(1h,120°C), pH 3-4(HCl)	BSTFA (1h, 70°C)	GC-MS	Gill 2010 <sup>129</sup>
Muestras de heces y aguas fecales	200mg	Esteroles	3 x ultrasonidos (20min, 35kHz a 30°C) DCM 50mL	-	BSTFA (Puerto de inyección del derivatizante)	GC-MS	Wu, 2009 <sup>132</sup>
Sedimentos	10g	Ácidos biliares	Soxhlet (24h) DCM:MeOH (2:1,v/v)	Saponificación 5mL KOH(5M) 90% MeOH(1h,120°C)	TMS (1h, 70°C)	GC-MS	Grimalt, 1990 <sup>119</sup>
Sedimentos arqueológicos	5g	Esteroles	4x ultrasonidos (30min) DCM/MeOH (3:1, v/v) 40°C	-	BSTFA	GC-MS	Sistiaga 2014, <sup>136</sup>
Muestras de heces	0,1-1g	Esteroles	3 x ultrasonidos (30min) DCM/MeOH (3:1, v/v)	Saponificación 5mL NaOH(2M) 90% MeOH TLE (1h,100°C)	BSTFA (30min,60°C)	GC-MS	Sistiaga 2015 <sup>133</sup>
Sedimentos	1g	Esteroles	PLE 20 mL DCM ( 150°C,1500 psi)	-	BSTFA (1h, 70°C)	GC-MS	Battistel 2015 <sup>134</sup>
Muestras de heces y arqueológicas	100mg-10g	Esteroles y ácidos biliares	PLE DCM/MeOH (2:1 y 3:1, v/v) (100°C, 5min tratamiento térmico, 5min de reposo, 3 ciclos.	Saponificación 3,5mL KOH (5%) MeOH. 12-14h	Esteroles HMDS (1h, 70°C) Ácidos biliares (1h, 80°C)	Análisis de esteroles y ácidos biliares por separado GC-MS	Prost, 2017 <sup>96</sup>
Muestras arqueológicas	5g	Esteroles y ácidos biliares	MAE 25ml DCM/MeOH (2:1, v/v) 20 min, hasta 150 °C	Saponificación 5mL KOH(2M) ( MeOH:Mill-Q, 10:1, v/v)	BSTFA (1h, 70°C)	GC-MS	Gea, 2017 <sup>126</sup>
Muestras de heces	0,1g	Esteroles y ácidos biliares	ASE 20mL Hexano/alcohol de Isopropilo (3:2, v/v, 2% ácido acético) 2178psi, 60°C, 30min	-	-	HPLC-APCI-MS	Hong, 2007 <sup>137</sup>
Muestras de heces	0,5g	Alcanos	2x LLE Heptano / agua (7mL:2mL,v/v)	KOH(1M)( Etanol,14h 90°C)	-	GC-FID	wang, 2013 <sup>115</sup>
Muestras de heces	1g	Alcanos	LLE Hexano/agua (5mL:2mL,v/v)	KOH(1M) solución alcohólica, noche, 90°C	-	GC-FID	Olivan, 1994 <sup>138</sup>

Tabla 1.3 Continuación

MUESTRA	CANTIDAD	ANALITOS	TÉCNICA DE EXTRACCIÓN Y DISOLVENTES	HIDRÓLISIS	DERIVATIZACIÓN	ANÁLISIS	REF
Restos de hiervas	1g	Alcanos	LLE Heptano/agua (8ml:5ml)5min, 45°C	KOH (1,5M) solución alcohólica, noche,90°C	-	GC-FID	Laredo, 1991 <sup>139</sup>
Muestras de heces/ restos de hiervas	0,5g/1,5g	Alcanos	LLE Hexano/agua (14:4 hiervas; 7:2 heces)	KOH(1M) Etanol 14mL hiervas;7mL heces, 4-5h, 90°C	-	FID	Vulich, 1991 <sup>140</sup>
Sedimentos	5g	Alcanos	Ultrasonidos 30mL DCM/Hexano (1:1, v/v)	-	-	GC-MS	Wang,S 2019 <sup>141</sup>
Sedimentos	indeterminado	Alcanos	Soxhlet DCM 72h	-	-	GC-MS	Xia, 2017 <sup>142</sup>
Sedimentos	10g	Alcanos	MASE	-	-	GC-MS	Wang,S 2018 <sup>143</sup>
Muestras de heces/orina	0,1g	Hormonas	LLE Etanol/MeOH	NaCl saturado, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2,4M),2h, 40-60°C	-	ELISA RIA	Ziegler, 1996 <sup>144</sup>
Muestras de heces/orina	0,1-0,15g	Hormonas	LLE MeOH/agua (80:10,v/v) 6mL	HCL(0,1M) +Enzimática, pH 5(b-glucuronidasa/Sulfatasa) 18-20h,37 °C	-	HPLC-MS-MS	Weltring, 2012 <sup>145</sup>
Muestras de orina, agua, pelo, comida	0,1g	Hormonas	LLE(MeOH, Etanol, Octano (27:8:60 v/v/v)	Ácido acético(0,2M) pH 4,8+ enzimas de desconjugació)	MSTFA	LC-MS-MS GC-MS-MS	Nielen, 2007 <sup>146</sup>
Restos arqueológicos cerámicas	1g cerámicas 1-2mg aceite de ballena	TG y AG	MAE TGs:CHCl <sub>3</sub> :Hexano 600 y300 µL (600w,80 °C,25min) AGs: :CHCl <sub>3</sub> :Hexano 600 µL 200W,60min, 80 °C	Saponificación KOH 10% se realiza con la extracción	BSTFA (30min, 70°C)	GC-MS HPLC-ESI-Q-ToF	Blanco-Zubiaguirre, 2018 <sup>80</sup>
Residuos orgánicos arqueológicos	1-10mg	TGs	Ultrasonidos 40M 40minDCM/MeOH (1:1,v/v 3-20mL)	-	-	HPLC-ESI-Q-ToF	Saliu, 2014 <sup>70</sup>
Restos de madera arqueológica	1-2 mm trozos de madera	Ligninas	-	-	HDMS(5µL)	PY-GC-MS EGA-MS	Tamburini, 2016 <sup>147</sup>
Restos de madera arqueológica	0,5mg de madera	Ligninas	-	-	HDMS(5µL)	EGA-MS	Tamburini, 2015 <sup>148</sup>
Restos de madera arqueológica	100µg madera	Ligninas	-	-	HDMS(5µL)	PY-GC-MS EGA-MS	Lucejko, 2012 <sup>149</sup>

TG-Triglicéridos; AG-Ácidos grasos; LLE- Extracción Líquido-Líquido; MAE-Extracción Asistida por Microondas; SPE- Extracción en Fase Sólida; MSTFA-N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida;BSTFA-N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida; HDMS-1,1,1,3,3,3-Hexametildisilazano

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) emplean el fenómeno de la cavitación, dado por la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor o gas debido a la acción del campo ultrasónico dentro de un líquido generándose microexplosiones y obteniéndose así temperaturas y presiones elevadas,  $\sim 5000^{\circ}\text{C}$  y  $\sim 2000\text{atm}$  respectivamente. Estas temperatura y presiones provocan la ruptura de estructuras, reducción del tamaño de las partículas y un incremento del contacto con el disolvente<sup>150</sup> (Figura 1.11).



**Figura 1.11** Mecanismo de formación de burbujas debido a un campo ultrasónico.

Le UAE puede llevarse a cabo en un baño o mediante una sonda de titanio o vidrio que se introduce directamente en la muestra (Figura 1.12).



**Figura 1.12** a) Baño de ultrasonidos, b) Sonda de ultrasonidos

La ventaja de la sonda frente al baño es su mayor repetitividad, la posibilidad de controlar la amplitud y los ciclos de irradiación y la disminución de los tiempos de extracción al tratarse de una irradiación directa. Sin embargo, a la hora de procesar un gran número de muestras, el uso del baño es aconsejable ya que se puede extraer varias muestras a la vez y no es necesaria una etapa de limpieza entre extracciones. Como se puede observar en la Tabla 1.3, las muestras son sometidas a ciclos continuos de ultrasonidos de entre 20 y 30 minutos y temperaturas comprendidas entre 30-40°C<sup>88,132,133</sup>.

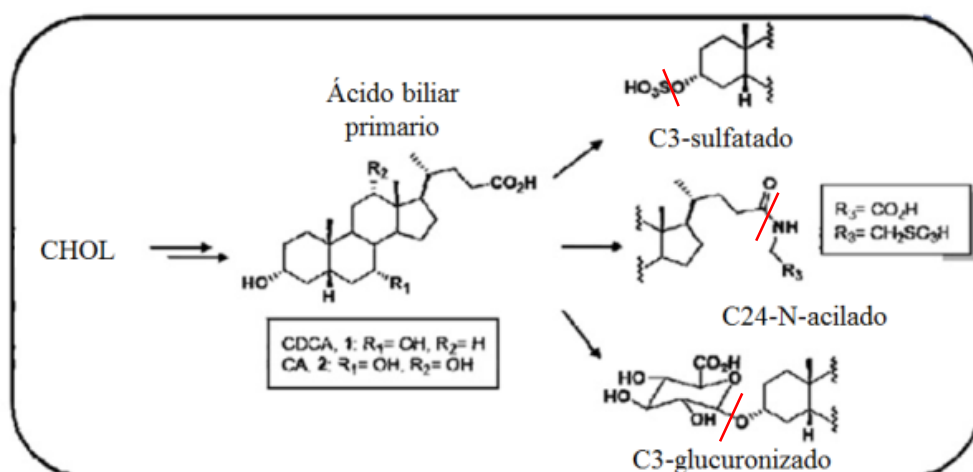
La extracción asistida por microondas (MAE) emplea un campo dieléctrico que interactúa sobre las moléculas polares y sus iones. Este campo electromagnético varía constantemente con velocidades de  $2,4 \times 10^9$ /s y frecuencias de 2450 MHz, obligando a las moléculas polares o iónicas a rotar en la dirección del campo, generando fricción y un aumento de la temperatura<sup>151</sup>. El aumento térmico es instantáneo en las moléculas polares o iónicas y sus inmediaciones, mientras que en el resto de compuestos el calentamiento es progresivo ya que depende de la distribución pasiva del calor a través del material por conducción<sup>152</sup>. Del mismo modo, los sistemas cerrados de MAE, posibilitan el control/aumento de la presión durante la extracción, lo que aumenta la temperatura de ebullición del disolvente de extracción, lográndose así mayores temperaturas que aceleran la etapa de extracción. Durante el proceso de MAE, las muestras son tratadas durante periodos de tiempo desde 20 a 60 minutos y temperaturas comprendidas entre los 80 y 150°C<sup>80,126</sup>. La extracción de compuestos presentes en *fumiers* usando MAE no ha sido utilizado hasta ahora, siendo el Soxhlet<sup>68,69,130,153</sup> y la sonicación<sup>88</sup> las técnicas habituales de extracción de compuestos lipídicos en Arqueología, aunque también se ha usado la extracción líquida a alta presión<sup>134</sup>(PLE). Mediante la extracción por microondas (MAE) se ha obtenido resultados satisfactorios y reproducibles en la caracterización de residuos orgánicos prehistóricos<sup>126</sup>. Como se puede observar en la Tabla 1.3, los disolventes o mezclas de disolventes comúnmente utilizados para la extracción de *n*-alcanos son una mezcla de hexano o heptano en agua en diferentes proporciones<sup>87,138-143</sup>, mientras que para la extracción conjunta de esteroides, fitoesteroides y ácidos biliares se emplea una mezcla de DCM en metanol o acetona en diferentes



proporciones<sup>67,88,126,129-131,133</sup>. Por otro lado, la extracción de las hormonas de muestras de heces se realiza mediante una mezcla de metanol o etanol en agua en diferentes proporciones<sup>144,145</sup>.

### 1.4.3 Saponificación e hidrólisis ácida

La saponificación se realiza con el objeto de liberar tanto a esteroides y ácidos biliares de su forma conjugada, que es la que en mayor proporción se encuentran en las heces. Para ello se emplea una sal saturada en metanol al 90%, generalmente KOH o NaOH, combinado con tratamiento térmico de entre 90 y 100 °C<sup>67,126,129-131</sup>, durante un tiempo de entre 1h y 14 h (Figura 1.11 B). Por otro lado, también se puede proceder a realizar una hidrólisis ácida con un ácido fuerte como el ácido clorhídrico (HCl 2-5 M) (Figura 1.13).<sup>67,129</sup>



**Figura 1.13.** Esquema de las diferentes estructuras conjugadas de los ácidos biliares

### 1.4.4 Limpieza

Una vez realizada la etapa de hidrólisis es necesario realizar una etapa de limpieza o clean-up. Dentro de las técnicas de limpieza y purificación de los extractos obtenidos se ha empleado la extracción en fase sólida (SPE)<sup>67,87,132,134,139</sup>, la cual viene siendo la

técnica de referencia habitual en los procesos de *clean-up*. En el caso de SPE, los adsorbentes más utilizados para este tipo de muestras son los de sílice<sup>126</sup>.

Una vez finalizada la etapa de limpieza, el análisis de este tipo de analitos se realiza mediante cromatografía de gases (GC) o de líquidos (LC) acopladas a un espectrómetro de masas (MS)<sup>88,129,131,132,145,146</sup>.

#### 1.4.5 Análisis mediante la utilización de espectrometría de masas

La utilización de la espectrometría de masas (MS) se viene aplicando con éxito en el análisis de muestras arqueológicas, siendo la técnica más habitual en lo referente al análisis de compuestos orgánicos en diferentes matrices. Puede afirmarse que una gran parte de los biomarcadores de origen orgánico que hoy en día se utilizan en Arqueología, se detectan y cuantifican por un análisis por espectrometría de masas<sup>58</sup>. Existe una extensa bibliografía donde se aplica la MS para el análisis de los compuestos orgánicos en Arqueología, utilizándose en la mayoría de los trabajos el analizador de cuadrupolo (Q)<sup>67,126,129,130,132</sup>. Su uso mayoritario se debe a su sencillez de manejo y robustez, frente a la utilización de analizadores como el de trampa de iones (IT), de tiempo de vuelo (TOF), de triple cuadrupolo (QQQ) u Orbitrap, más complejos y de mayor resolución y/o sensibilidad. Los resultados obtenidos con detectores de cuadrupolo sencillo son aceptables cuando se analizan grupos de sustancias específicas, a concentraciones no muy bajas, como es el caso de los analitos objeto de estudio en los *fumiers*.

##### 1.4.5.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

En el caso de los *n*-alcanos, para la separación cromatográfica se suelen utilizar columnas capilares de fase estacionaria de sílice fundido, inyectándose en modo sin división de muestra o “*splitless*” cantidades de muestra en torno a 1-2 $\mu$ L. Se trabaja en modo SIM, con fuente de ionización de IE a 70 eV, con rampas térmicas en el horno iniciales de 50-70°C que finalizan a temperaturas de 290-300°C con periodos isotérmicos entre rampas<sup>141-143</sup>.

Por otro lado, y debido a la presencia de grupos alcohol y ácidos, en los esteroides, fitoesteroides, ácidos biliares y hormonas, se necesita una etapa previa de derivatización antes de ser analizados mediante GC-MS<sup>67,88,96,126,129-134,146</sup>. Existen diferentes tipos de derivatización entre las que destacan la sililación, la acilación y la alquilación<sup>154</sup>, siendo la primera la más utilizada para este tipo de compuestos. La sililación consiste en la sustitución de algún átomo de hidrógeno activo del analito por un grupo trimetilsilil (Figura 1.14)<sup>154</sup>, que genera compuestos más volátiles. Generalmente, dentro de la sililación, la trimetil sililación es la más común a la hora de derivatizar este tipo de analitos, empleando generalmente N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)<sup>154</sup>. Este tipo de derivatizaciones se suelen llevar a cabo aplicando temperaturas de entre (60-70°C) mediante un horno o una estufa durante un tiempo de 0,5 a 1 hora<sup>88,126,129,132-134</sup>. Existen otras alternativas para acelerar este proceso, como son el uso de US<sup>155</sup> o MAE<sup>156</sup> pero son menos habituales.



**Figura 1.14.** Reacción de sililación del grupo -OH

Una vez derivatizados, se procede a la separación cromatográfica, en la que se utilizan columnas capilares de fase estacionaria de sílice fundida, inyectándose volúmenes de 2-5µL en “splitless”, trabajando en modo SIM, con fuente de ionización de IE a 70 eV y con temperaturas del horno inicial de 40-180 °C, acompañado de rampas de temperatura que finalizan en los 300-350°C, con periodos isotermos entre rampas<sup>126,133</sup>.

Una alternativa para eliminar la etapa de derivatización y analizar esteroides, fitoesteroides, ácidos biliares y hormonas es el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS)<sup>137,157,158</sup>.

#### 1.4.5.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) es la más ampliamente utilizada Para la separación cromatográfica de esteroides, fitoesteroides, ácidos biliares y hormonas , siendo las fases estacionarias más comunes las de tipo C<sub>18</sub> y C<sub>8</sub> por tratarse de compuestos lipofílicos<sup>137,157,158</sup>. Se suele fijar una temperatura de la columna que varía de 20 a 35°C. La fase móvil puede estar formada por mezclas de dos o tres disolventes, entre los que destacan el metanol, etanol, acetonitrilo y el agua, trabajando en modo gradiente, generalmente empezando por concentraciones bajas de los disolventes más afines a los analitos objeto de estudio, que irán aumentando hasta el 100% al final del análisis. Es habitual fijar un flujo estable de fase móvil que puede variar de 0,6-0,8 mL/min y el volumen de inyección de la muestra que se introduce en el sistema viene a ser de 1-2µL<sup>137,157-159</sup>.

En cuanto a la MS y en lo relativo a la fuente de ionización a utilizar, la mayoría de los estudios optan por la ionización química a presión atmosférica (APCI) frente a la ionización por electrospray (ESI). Ello es debido a las características químicas de los analitos objeto de estudio, compuestos lipófilos con pocos grupos funcionales polares en su estructura y difíciles de ionizar por ESI<sup>160</sup>. Con fuentes de ionización APCI se suele trabajar en modo ion positivo (APCI +), empleando corriente de aguja corona entre 3000-4000V, voltaje del capilar de 300V, temperatura y flujo del gas de secado entre 300-400°C y 3-4L/min respectivamente y presión del gas nebulizador entre 20-40psi<sup>137,157-159</sup>.

#### 1.4.6 Análisis de lignocelulosas

El análisis de las lignocelulosas sobre muestras sólidos se lleva a cabo mediante metodologías sencillas, en las que una vez homogenizada la muestra se realiza el análisis directamente. Para ello, se utiliza un sistema de pirolisis (Py) acoplado a un GC-MS (Py-GC-MS)<sup>70,147,149,161</sup> o directamente a un sistema de análisis de gases envolventes, *evolved gas analysis* (EGA-MS)<sup>148,162-164</sup>.

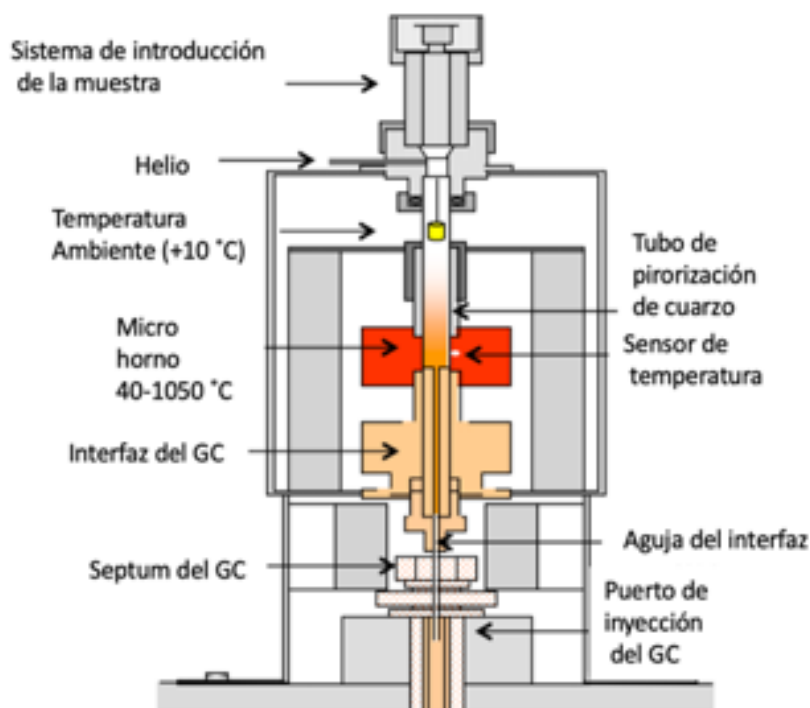
#### 1.4.6.1 Pirólisis

La pirólisis es definida como la descomposición química de materiales orgánicos por el calor en ausencia de oxígeno, llevándose a cabo habitualmente a temperaturas de entre 300°C y 800°C. A estas temperaturas los productos se transforman en gases, líquidos y cenizas. Las proporciones relativas de los elementos producidos dependen de la composición de la muestra, de la temperatura y del tiempo que ésta se aplique.

La pirolisis como técnica analítica se puede aplicar a un alto número de materiales donde destacan los polímeros tanto naturales como sintéticos, aditivos, plásticos, fibras naturales, maderas y textiles y presenta una ventaja sustancial con respecto a otras técnicas ya que no requiere de ninguna etapa tediosa de preparación de la muestra para su análisis previo (o si este es necesario es mínimo) y la cantidad de muestra necesaria para realizar el análisis es muy pequeña <sup>165</sup>(Figura 1.15).

En numerosas ocasiones y con el objeto de mejorar la eficiencia analítica, la utilización de derivatizantes como el hexametildisilazano (HMDS)<sup>149,161,166-168</sup>, puede ayudar a la separación cromatográfica (PY-GC-MS) y a una mejor respuesta analítica de los compuestos polares<sup>169-171</sup>.

Dentro de las técnicas de pirolisis acopladas a espectrofotometría de masas son la PY-GC-MS y EGA-MS, son las técnicas más flexibles y extensamente utilizadas para caracterizar lignocelulosas<sup>148,172-178</sup>.



**Figura 1.15:** Equipo de pirólisis, Frontier EGA/PY-3030 Multi-shot-pyrolyzer.

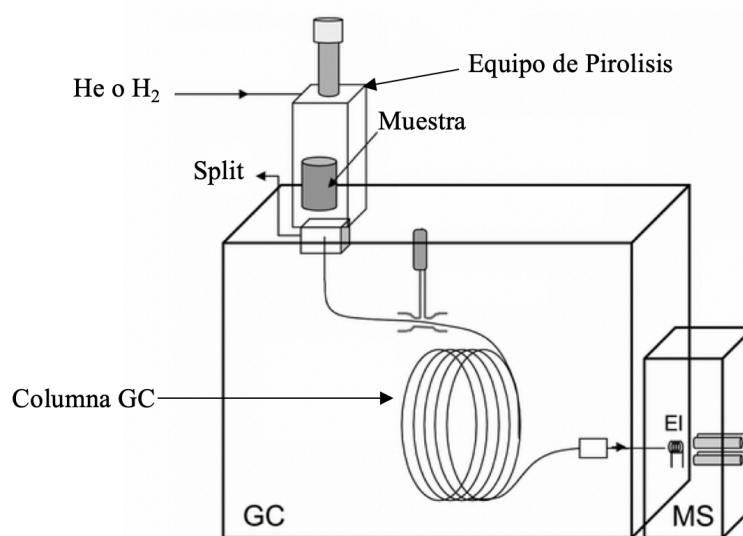
#### 1.4.6.2 PY-GC-MS

Mediante esta técnica se consigue transformar polímeros complejos en monómeros de bajo peso molecular, analizando los productos de la pirólisis que la muestra ha generado que se verán expresados en un cromatograma.

Se parte de muestras previamente secadas en horno, y por norma general se suele homogenizar las muestras. La cantidad de muestra a analizar es relativamente pequeña y suele estar entre 100-200  $\mu\text{g}$ <sup>147,179,180</sup>. Las muestras son pesadas en el recipiente de pirólisis y se les añade, en el caso que proceda de 5-7  $\mu\text{L}$  del derivatizante hexametildisilazano (HMDS)<sup>180</sup>. Una vez introducida la muestra en el pirólizador se puede proceder de dos maneras: una pirólisis directa o “single shot” donde la muestra es sometida a un proceso pirolítico de 500-550°C durante un periodo breve de tiempo

(20s), o una pirolización doble o “*double shot*” donde la muestra se somete a una primera degradación térmica de 280-300°C (20s), tras finalizar el análisis de esa primera degradación térmica, se somete a la misma muestra a una pirolisis completa con temperaturas de entre 600-700°C (20s)<sup>147,180</sup>. Después de la pirolización, el conjunto de compuestos generados es inyectado al sistema de cromatografía de gases, generalmente en modo “*split*” (1:5-1:18)<sup>147,175</sup>. Para la separación cromatográfica se suele emplear columnas capilares de fase estacionaria de sílice fundida, acompañado de rampas de temperatura en el horno que empiezan con 50-60°C y suelen terminar en 550-600°C con periodos isotermos entre rampas<sup>147,161,166</sup>.

Finalmente, en el espectrofotómetro de masas tras una ionización previa las moléculas son separadas en base a su masa/carga ( $m/z$ ) permitiéndose la identificación de los productos de la pirolisis. Para ello el espectrofotómetro de masas suele trabajar en modo positivo, SCAN  $m/z$  50-600, fuente de ionización y cuadrupolo con temperaturas de 230 y 150°C respectivamente<sup>147</sup> (Figura 1.16).



**Figura1.16:** Equipo de PY-GC-MS.

### 1.4.6.3 EGA-MS

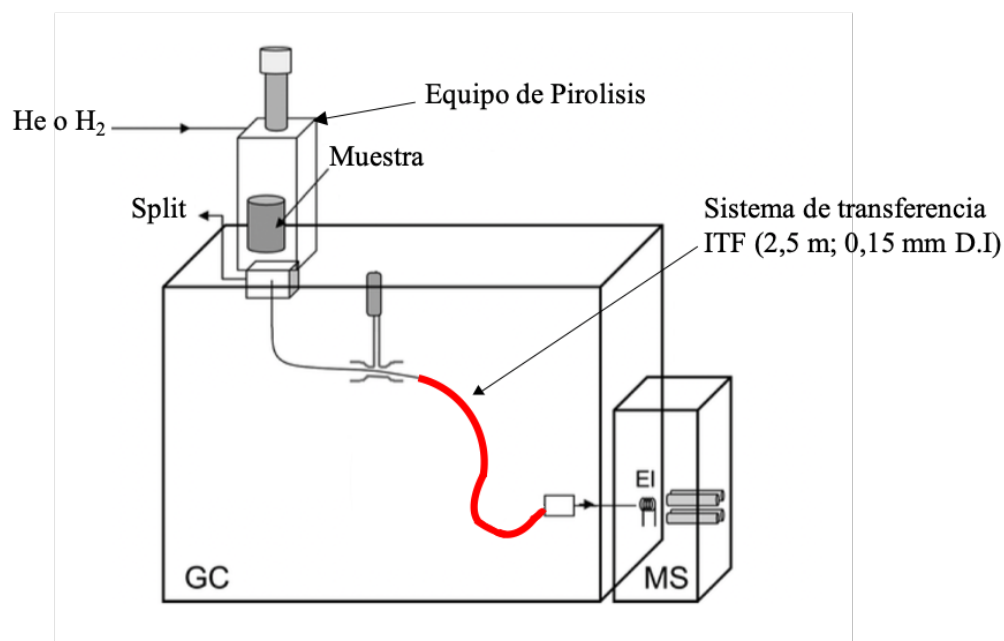
Se trata de una técnica de pirolisis no isoterma, en la que el proceso pirolítico se realiza aplicando una rampa térmica en función del tiempo. A diferencia de la pirolisis por PY-GC-MS la expresión final no es un cromatograma sino un termograma, donde en el eje de las abscisas se representa la temperatura y no tiempo de retención ( $t_R$ ) (Figura 1.17).

La *Envolved gas analysis* (EGA) junto con la termogravimetría (TG) son las dos principales técnicas que se emplean para obtener información de la degradación térmica de cualquier polímero (en el presente caso sería la lignocelulosa) a medida que se va incrementando la temperatura del proceso pirolítico<sup>181</sup>.

El proceso de pesada, homogenización y derivatización es similar al realizado en la PY-GC-MS. El proceso de pirolisis se realizará mediante una rampa de temperatura a lo largo del tiempo, empezando con temperaturas de 50-60°C y finalizando con temperaturas de 600-700°C<sup>148,163</sup> Tras la pirolisis, igual que en la PY-GC-MS, el conjunto de compuestos generados es inyectado (generalmente en modo división de muestra o “*split*” (1:20-1:50))<sup>148,164</sup> directamente al MS a través de un sistema de transferencia totalmente inactivo (ITF) frente a los compuestos y utilizando He como gas acompañante (1mL/min). Por otro lado, es importante mantener la temperatura del horno a 300°C para evitar condensaciones del gas circundante.

Igual que con PY-GC-MS el espectrofotómetro de masas suele trabajar en modo positivo, SCAN ( $m/z$  50-600), con fuente de ionización y cuadrupolo a temperaturas de 230 y 150 ° C respectivamente<sup>148</sup>.





**Figura 1.17:** Equipo de EGA-MS

## 1.5 Procesado y análisis de datos

A la hora de identificar el origen animal de las heces prehistóricas, como alternativa al uso de ecuaciones y relaciones de los analitos, existe la posibilidad de utilizar herramientas quimiométricas que ayuden a clasificar los restos de los *fumiers*<sup>182 183</sup>

Ante la imposibilidad de poder disponer de muestras de excrementos prehistóricos de cada uno de los animales, una alternativa es la de utilizar muestras de heces actuales al objeto de compararlas con las prehistóricas. Es evidente que no se pueden relacionar directamente las concentraciones actuales con las prehistóricas, ya que debido al paso de el tiempo, la concentración de estos analitos ha ido disminuyendo, sin embargo, se considera que la relación entre los analitos se mantienen constante. Esta última afirmación puede estar en entre dicho.

El análisis de datos a través de la Quimiometría se ha vuelto una herramienta indispensable en los laboratorios de análisis debido al incremento de volumen de información que genera una investigación. Gracias al análisis estadístico multivariante

(*multivariate statistical analysis*, MVA), es posible trabajar con una gran cantidad de información, siendo el método de análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*, PCA), una de las técnicas más utilizadas<sup>184,185</sup>. Un PCA es una herramienta de análisis multivariante que se utiliza para describir un conjunto de datos en términos de nuevas variables no relacionadas, y entre sus virtudes destaca la reducción de la dimensionalidad de un conjunto de datos, con lo que se facilita su visualización. Los primeros componentes principales describen la mayor parte de la varianza de los datos, incrementándose en la medida que aumentan la correlación de las variables<sup>186</sup> (Figura 1.18).

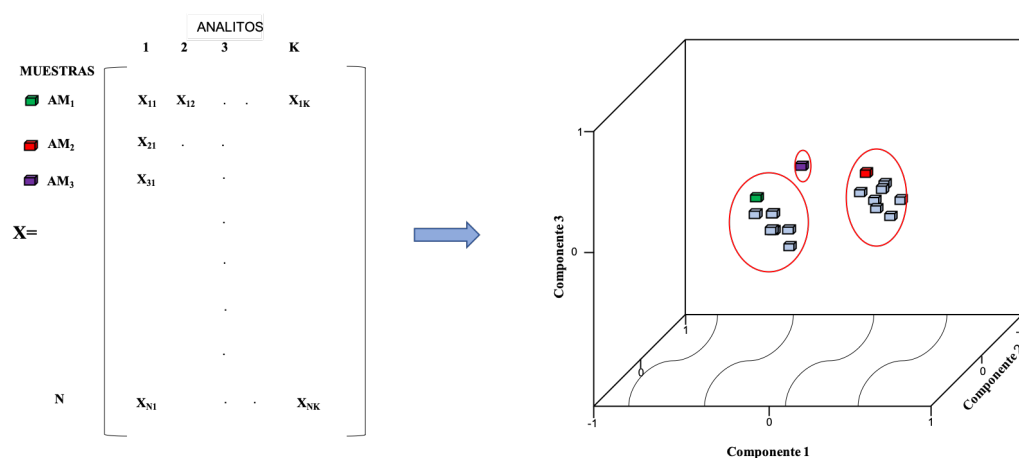


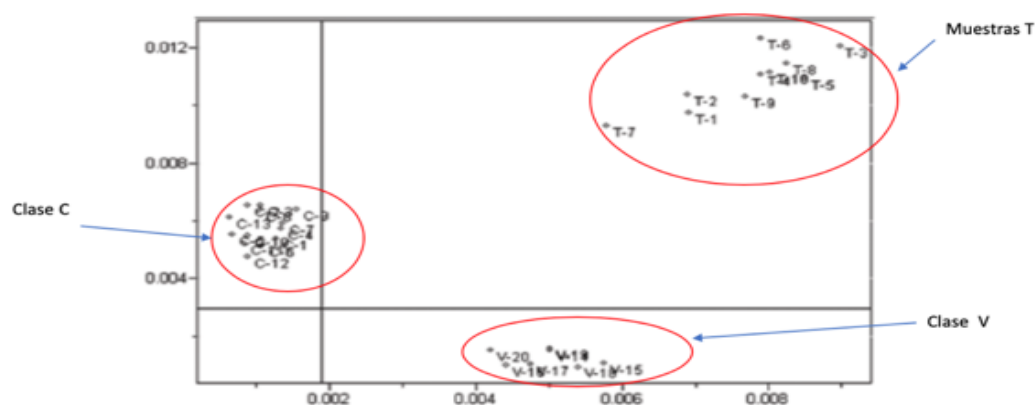
Figura 1.18. Representación de un PCA, Principal Component Analysis en 3D

Un PCA no es un método de clasificación de muestras, pero gracias a él se pueden formar modelos que permiten comparar como de iguales o diferentes son un conjunto de muestras.

Para clasificar las muestra utilizando los modelos generados con los PCA, se usan la herramientas como el “*soft independent modelling by class analogy (SIMCA)*”, que constituye uno de los métodos de clasificación más utilizados en Quimiometría<sup>187,188</sup>. Se trata de un modelo de reconocimiento de patrones basado en el principio de analogía

entre las muestras que pertenecen a la misma clase. Para ello se crea un modelo PCA para cada una de las clases o categorías a representar y a continuación se calcula sus frontera o límites para un intervalo de confianza del 95%<sup>188-190</sup>. A continuación, se construye un modelo SIMCA para un conjunto de muestras conocidas, “*training set*” para comprobar la efectividad del modelo creado y si los resultados son los esperados se hace lo mismo con muestras desconocidas “*test set*”, con el objeto de que pueda asignarse a una categoría, a más de una o a ninguna, haciéndose un cálculo de probabilidad de cada asignación.

Los gráficos de resultados generados por el modelo SIMCA presentan las distancias octogonales de todas las muestras del conjunto de calibración respecto a las dos clases. Se puede observar visualmente a que categoría o clase pertenecen las muestras desconocida (Figura 1.19). Así, en el ejemplo de la Figura 1.18 se observa que las muestras T se encuentran igual de alejadas de la clase C y la clase V, por lo que no se puede asignar ninguna de las muestras a una categoría o clase.



**Figura 1.19:** Ejemplo de modelo SIMCA donde se pueden observar la distancia de las muestras T con respecto a las clases C y V, las líneas continuas representan los límites de las clases para un intervalo de confianza del 95%.

Estas técnicas generan modelos de datos aportados por una investigación que son representativos, fidedignos y de fácil visualización. Sin estas herramientas las investigaciones con un alto volumen de datos y variables serían difícilmente interpretables.

## 1.6 BIBLIOGRAFIA

1. Fernández-Eraso, J. La actividad pecuaria en la Rioja Alavesa durante la prehistoria reciente. 159–171 (2010).
2. Vigne, J.-D., Carrère, I., Briois, F. & Guilaine, J. The Early Process of Mammal Domestication in the Near East. *Current Anthropology* **52**, S255–S271 (2011).
3. Larson, G. & Fuller, D. Q. The Evolution of Animal Domestication. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **45**, 115–136 (2014).
4. Fernández-Eraso, J. *et al.* Beginnings, settlement and consolidation of the production economy in the Basque region. *Quaternary International* **364**, 162–171 (2015).
5. Angelucci, D. E. *et al.* Shepherds and karst: the use of caves and rock- shelters in the Mediterranean region during the Neolithic. 191–214 (2009).
6. Carrancho, Herrejón Lagunilla & Vergès, J. M. Three archaeomagnetic applications of archaeological interest to the study of burnt anthropogenic cave sediments. *Quaternary International* **414**, 244–257 (2016).
7. Fernández Eraso, J. U. D. P. V. (España) & Polo Díaz, A. U. D. P. V. (España). Establos en abrigos bajo roca de la Prehistoria Reciente: su formación , caracterización y proceso de estudio. Los casos de Los Husos y de San Cristóbal. 2008. pp39-51. *Krei* **10**, 39–51 (2008).
8. Boschian, G. & Miracle, P. T. Shepherds and caves in the karst of Istria (Croatia). *Atti della Societa Toscana di Scienze Naturali, Memorie Serie A* **112**, 173–180 (2007).
9. Polo-Diaz, A, & Fernandez Eraso, J. Same anthropogenic activity, different taphonomic processes: A comparison of deposits from Los Husos I & II (Upper Ebro Basin, Spain). *Quaternary International* **214**, 82–97 (2010).
10. Vergès, J. M. *et al.* The Mas del Pepet experimental programme for the study of prehistoric livestock practices: Preliminary data from dung burning. *Quaternary International* **414**, 304–315 (2016).
11. Bergadà, M. M. Actividad antrópica registrada en algunas secuencias arqueológicas en cueva del Neolítico antiguo catalán a través del análisis micromorfológico. *Trabajos de Prehistoria* **54**,(2): 151–62. (1997).

12. Bergadà , M. M., Cebrià , A. and Mestres, J. Practicas de estabulación durante el Neolítico Antiguo en Cataluña a través de la micromorfología: cueva de la Guineu (Font- Rubí, Alt Penedès, Barcelona). In Actas del III Congreso del Neolítico de la Península Ibérica (eds P. Arias, R. Ontañón and C. Ga. (2005).
13. Blasco, A., Edo, M., Villalba, M.J. and Buxó, R. Del cardial al postcardial en la cueva de Can Sadurní (Begues, Barcelona): primeros datos sobre su secuencia estratigráfica, paleoeconómica y ambiental. In Actas del II Congreso del Neolítico a la Península Ibérica. València: Universitat de València, pp. 59–. (1999).
14. Badal, E. El Potencial pecuario de la vegetación mediterránea: las cuevas Redil. In Actas del II Congreso del Neolítico a la Península Ibérica. València: Universitat de València, pp.69-76. (1999).
15. Verdasco Cebrián.C.C. Depósitos naturales de cueva alterados: estudio microsedimentológico de acumulaciones producidas en el neolítico valenciano por la estabulación de ovicápridos. Cuaternario & Geomorfología **15**,(3–4): 85–94. (2001).
16. Cabanilles, J.J., Martínez Valle, R., Badal García, E., Orozko Kholër, T. and Verdasco Cebrián, C. Un aprisco bajo abrigo en el yacimiento eneolítico de ‘El Cinto Mariano’(Requena , Valencia). In Actas del III Congreso del Neolítico en la Península Ibérica(eds P. Arias, R. Ontañón and C. García Moncó). Santander: Universidad de Cantabria, pp 167-74. 167–74 (2005).
17. García Puchol, O. and Aura Tortosa, J. E. (eds). El abric de La Falguera (Alcoi, Alacant): 8000 años de ocupación humana en la cabecera del río de Alcoi. Alicante: Diputación de Alicante, Ayuntamiento de Alcoi y Caja de Ahorros del Mediterráneo. (2006).
18. Oms, X., Bargalló, A., Chaler, M., Fontanals, M., García, M. S., López, J. M., Morales, J. I. & Nievas, T., Rodríguez, A., Serra, J., Solé, A. and Vergès, J. M. La cova Colomera (Sant Esteve de la Sarga, Lleida), una cueva-redil en el Prepirineo de Lérida: primeros resultados y perspectivas de futuro. In Actas del IV Congreso del Neolítico Peninsular (eds M. S. Hernández, J. A. Soler and J. A. López). Alicante: M. (2008).
19. Brochier, J.-E. Estudi geològic dels dipòsits holocens de la Balma de la Margineda: capes 1 a 6. In Les excavacions a la Balma de la Margineda (1979–1991) (eds J. Guilaine and M. Martzluf). Andorra: Edicions del Govern d’Andorra, pp. 56–90. (1995).

20. Brochier, J. E. and Claustre, F. Le parage des bovins et le problème des litières du Néolithique final à l'Âge du Bronze dans la Grotte de Bélesta. In XXIVe Congrès Préhistorique de France: Habitats, économies et sociétés du Nord-Ouest méditerranéen en (Carcassonne, 26–30 Septembre) (1994).
21. Alday Ruiz, A., Fernandez Eraso, J. an. Y. Suelos de habitación: suelos de corrales: los casos de Atxoste y los Husos. 183–225 (2003).
22. Polo Díaz, A. and Fernández Eraso, J. Aportación de la micromorfología a la determinación de los rediles prehistóricos en el Alto Valle del Ebro: el caso del Neolítico de Los Husos II (El Villar, Álava). In Contribuciones al Estudio del Periodo Cuaternario (eds J. Lario and P. G. Silva). Ávila. (2007).
23. Vergès, J. M., Allué, E., Angelucci, D. E., Cebrià, A., Díez, C., Fontanals, M., Manyanós, A., Montero, S., Moral, S., Vaquero, M. and Zaragoza, J. La Sierra de Atapuerca durante el Holoceno: datos preliminares sobre las ocupaciones de la Edad del Bronce en la Cueva de El Mirador (Ibeas de Juarros, Burgos). *Trabajos de Prehistoria* **59**,(1): 107–26. (2002).
24. Vergès, J. M. *et al.* El Mirador cave (Sierra de Atapuerca, Burgos, Spain): A whole perspective. *Quaternary International* **414**, 236–243 (2016).
25. Brochier, J.-E. Sedimentologie, environnement et activités humaines du Néolithique aux temps historiques: les sédiments anthropiques de l'abri de Fontjuvenal. In Six mille'naires d'histoire de l'environnement: étude interdisciplinaire de l'abri sous roche de Font-Juvénal. (1988).
26. Argant, J., Heinz, C. and Brochier, J. L. Pollens, charbons de bois et sédiments: l'action humaine et la végétation, cas de la grotte d'Antonnaire (Montmaur-en-Diois, Drôme). *Révue d'Archéométrie* **15**, 29–40. (1991).
27. Brochier, J. E., Claustre, F. and Heinz, C. Environmental impact of Neolithic and Bronze Age farming in the eastern Pyrenees forelands, based on multidisciplinary investigations at La Caune de Bélesta (Bélesta Cave), near Perpignan, France. *Vegetation History and Archaeobotany* **7**, 1–9. (1998).
28. Sordoillet, D., Chiquet, P., Piguet-Wernli, M., Treffort, J.-M. and Voruz, J.-L. Anthropogenic sediments from Neolithic to Iron Age settlements: interpretation according to micromorphological, archaeozoological and archaeological data. In Proceedings of the 2nd International Conference on Soils and Archaeology (ed. G. Boschian). *Atti Soci.* (2008).

29. Brochier, J.-E. Bergeries et feux de bois néolithiques dans le Midi de la France: caractérisation et incidence sur le raisonnement sédimentologique. *Quaternaire*, **33-4**, 119–35. (1983).
30. Courty, M.-A., Goldberg, P. and Macphail, R. I. *Soils and Micromorphology in Archaeology*. Cambridge: Cambridge University Press. (1989).
31. Courty, M.-A., Macphail, R. and Watzel, J. 1. Soil micromorphological indicators of pastoralism: with special reference to Arene Candide, Finale Ligure, Italy. In *Archeologia della Pastorizia nell'Europa Meridionale* (eds R. Maggi, R. Nisbet and G. Barker). *Rivista di Studi Liguri* **2**(57), 127–50. (1992).
32. Macphail, R., Courty, M.-A., Hather, J., Watzel, J., Ryder, M., Cameron, N. and Branch, N. P. The soil micromorphological evidence of domestic occupation and stabling activities. In *Arene Candide: A Functional and Environmental Assessment of the Holocene Sequence (Excavations Bernabò Brea-Cardini 1940–50)* (eds R. Maggi, E. Starnini and B. Voytek). (1997).
33. Boschian, G. and Montagnari-Kokelj, E. Prehistoric shepherds and caves in the Trieste Karst (Northeastern Italy). *Geoarchaeology*, **15**(4): 331–71. (2000).
34. Boschian, G. and Miracle, P. T. Shepherds and caves in the Karst of Istria (Croatia). In *Proceedings of the 2nd International Conference on Soils and Archaeology* (ed. G. Boschian). *Atti Società toscana Scienze naturali, Mem., Serie A*, 112(2007), pp. 173–80. (2008).
35. Forenbaher, S. and Vranjican Pandžić, P. V. *ckapecina. Vaganacka Pecina*. (1985).
36. J., S. Stratigraphy, sedimentology, and site formation at Konispol Cave, Southwest Albania. *Geoarchaeology*, **16**(5): 559–602. (2001).
37. Iaconis, M. A. and Boschian, G. 2008. Geoarchaeology of the deposits of Grotta dei Piccioni and Grotta Sant'Angelo (Abruzzo, Central Italy). In *Proceedings of the 2nd International Conference on Soils and Archaeology* (ed. G. Boschian). *Atti Società Toscana Scienze Naturali, Mem., Serie A*, 112. (2008).
38. Rasmussen, P. 1989. Leaf-foddering of livestock in the Neolithic: archaeobotanical evidence from Weir, Switzerland. *Journal of Danish Archaeology*, **8**: 51–71. (1989).
39. Rasmussen, P. 1993. Analysis of goat/sheep faeces from Egolzwil 3, Switzerland: evidence for branch and twig foddering of livestock in the Neolithic. *Journal of Archaeological Science*, **20**: 479–502. (1993).



40. Akeret, O., Haas, J. N., Leuzinger, U. and Jacomet, S. 1999. Plant macrofossils and pollen in goat/ sheep faeces from the Neolithic lake-shore settlement Arbon Bleiche 3, Switzerland. *The Holocene* **9**,(2): 175–82. (1999).
41. Delhon, C., Martin, L., Argant, J. and Thiébault, S. 2008. Shepherds and plants in the Alps: multiproxy archaeobotanical analysis of neolithic dung from ‘La Grande Rivoire’ (Isère, France). *Journal of Archaeological Science* **35**, 2937–52. (2008).
42. Bagolini, B. 1980. *Riparo Gaban: Preistoria ed Evoluzione dell’Ambiente*. Trento: Museo Tridentino di Scienze Naturali.
43. Bagolini, B. and Pedrotti, A. 1996. I. R. G. (loc. P. di M. – T. In *Paleolitico, Mesolitico e Neolitico dell’Italia nord-orientale* (ed. A. Broglio). *Guide archeologiche, Preistoria e Protostoria in Italia*, vol. 4. Forli: ABACO, pp. 118–29. (1996).
44. Ojeda, A. O. & Arenaza, O. O. *Peña Larga: Memoria de las excavaciones arqueológicas*.
45. Fernández-Eraso, J. & Polo Díaz, A. Establos en abrigos bajo roca de la Prehistoria Reciente: su formación, caracterización y proceso de estudio. Los casos de Los Husos y de San Cristóbal. *Krei* **10**, 39–51 (2008).
46. Pérez González, A., Parés, J. M., Gallardo, J., Aleixandre, T. & Pinilla, A. Geología y Estratigrafía del relleno de Galería de la Sierra de la Sierra de Atapuerca (Burgos). in *Atapuerca: ocupaciones humanas y paleoecología del yacimiento de Galería* 31–42 (1999).
47. Aguirre, E. *et al.* The Atapuerca sites and the ibeas hominids. *Human Evolution* **5**, 55–73 (1990).
48. Blain, H. A. *et al.* Long-term climate record inferred from early-middle Pleistocene amphibian and squamate reptile assemblages at the Gran Dolina Cave, Atapuerca, Spain. *Journal of Human Evolution* **56**, 55–65 (2009).
49. Carbonell, E., Díez J.C., Enamorado, J. 198. El Pleistoceno medio en Atapuerca(Burgos). **63**:12–24 (1986).
50. Aguirre, E. ;Basabe, J. M. y T. Los fósiles humanos de Atapuerca (Burgos): nota preliminar. *Zephyrus* **26–27**, 489–511 (1976).
51. Ortega, A. I. *et al.* Las cuevas de la Sierra de Atapuerca y el uso humano del paisaje kárstico durante el Pleistoceno (Burgos, España). *Boletín Geológico Y Minero* **1129**, 83–105 (2018).

52. Angelucci. Shepherds and karst: the use of caves and rock- shelters in the Mediterranean region during the Neolithic. 191–214 (1999).
53. Angelucci, D. E. *et al.* Shepherds and karst: the use of caves and rock-shelters in the Mediterranean region during the Neolithic. *World Archaeology* **41**, 191–214 (2009).
54. Quirós Castillo, J. A., Nicosia, C., Polo-Díaz, A. & Ruiz del Árbol, M. Agrarian archaeology in northern Iberia: Geoarchaeology and early medieval land use. *Quaternary International* **346**, 56–68 (2014).
55. Martín-Rodríguez, P. & Vergès, J. M. Bone alterations in fumiers: Experimental approach. *Quaternary International* **414**, 294–303 (2016).
56. Mallol, C. *et al.* The black layer of Middle Palaeolithic combustion structures. Interpretation and archaeostratigraphic implications. *Journal of Archaeological Science* **40**, 2515–2537 (2013).
57. Expósito, I. & Burjachs, F. Taphonomic approach to the palynological record of burnt and unburnt samples from El Mirador Cave (Sierra de Atapuerca, Burgos, Spain). *Quaternary International* **414**, 258–271 (2016).
58. Evershed, R. P. Organic residue analysis in archaeology: The archaeological biomarker revolution. *Archaeometry* **50**, 895–924 (2008).
59. Wells, E. C., in: Smith, C. (Ed.). *Encyclopedia of Global Archaeology*. Springer, New York, pp. 910–911 (2014).
60. Brown, T. A., Brown, K. *Biomolecular Archaeology: An Introduction*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK (2011).
61. Bull, I. D., Betancourt, P. P., Evershed, R. P. Chemical evidence supporting the existence of a structured agricultural manuring regime on Pseira island, Crete during the Minoan Age. *Aegaeum*, **20**, 69–75. 69–75 (1999).
62. Evershed, R. P., Bethell, P. H., A. *Archaeological Chemistry: Organic, Inorganic, and Biochemical Analysis*. American Chemical Society, Washington DC, pp. 157–172. 157–172 (1996).
63. Medeiros, P.M., Simoneit, B. R. T. No TitlGas chromatography coupled to mass spectrometry for analyses of organic compounds and biomarkers as tracers for geological, environmental, and forensic research. *J. Sep. Sci.***30**, 1516–1536.e. 1516–1536 (2007).

64. McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nuñez, A., Butrym, E. D., Richards, M. & P., Wang, C.-S., Cheng, G., Zhao, Z., and Wang, C. Fermented beverages of pre- and proto-historic China, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**, 17 593–8. (2004).
65. Sistiaga, A., Berna, F., Laursen, R. & Goldberg, P. Steroidal biomarker analysis of a 14,000 years old putative human coprolite from Paisley Cave, Oregon. *Journal of Archaeological Science* **41**, 813–817 (2014).
66. Fisher, E. *et al.* Molecular marker records of land use change. *Organic Geochemistry* **34**, 105–119 (2003).
67. Bull, I. D., Elhmmali, M. M., Roberts, D. J. & Evershed, R. P. The application of steroidal biomarkers to track the abandonment of a Roman wastewater course at the Agora (Athens, Greece). *Archaeometry* **45**, 149–161 (2003).
68. Bull, I. D., Simpson, I. A., Dockrill, S. J. & Evershed, R. P. Organic geochemical evidence for the origin of ancient anthropogenic soil deposits at Tofts Ness, Sanday, Orkney. *Organic Geochemistry* **30**, 535–556 (1999).
69. Bull, I. D., Lockheart, M. J., Elhmmali, M. M., Roberts, D. J. & Evershed, R. P. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environment International* **27**, 647–654 (2002).
70. Saliu, F., Degano, I. & Colombini, M. P. Identification of triacylglycerols in archaeological organic residues by core-shell reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1346**, 78–87 (2014).
71. Ecker, M. *et al.* Middle pleistocene ecology and neanderthal subsistence: Insights from stable isotope analyses in Payre (Ardèche, southeastern France). *Journal of Human Evolution* **65**, 363–373 (2013).
72. Hardy, K. *et al.* Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften* **99**, 617–626 (2012).
73. Lin, D. S. & Connor, W. E. Fecal steroids of the coprolite of a Greenland Eskimo mummy, AD 1475: A clue to dietary sterol intake. *American Journal of Clinical Nutrition* **74**, 44–49 (2001).
74. Baeten, J. *et al.* Faecal biomarker and archaeobotanical analyses of sediments from a public latrine shed new light on ruralisation in Sagalassos, Turkey. *Journal of Archaeological Science* **39**, 1143–1159 (2012).

75. Hervé Bocherens, Dorotheé G. Drucker, Daniel Billiou d, Marylène Patou-Mathis, B. V. Isotopic evidence for diet and subsistence pattern of the Saint-Césaire I Neanderthal: review and use of a multi-source mixing model. *Thermochimica Acta* 71–87 . doi:10.1016/j.jhevol. 2005.03.003 (2004)
76. Pecci, A., Giorgi, G., Salvini, L. & Cau Ontiveros, M. Á. Identifying wine markers in ceramics and plasters using gas chromatography-mass spectrometry. Experimental and archaeological materials. *Journal of Archaeological Science* **40**, 109–115 (2013).
77. Regert, M., Garnier, N., Decavallas, O., Cren-Olive, C. & Rolando, C. Structural characterization of lipid constituents from natural substances preserved in archaeological environments. *Measurement Science and Technology* **14**, 1620–1630 (2003).
78. Lucejko, J. J. *et al.* Long-lasting ergot lipids as new biomarkers for assessing the presence of cereals and cereal products in archaeological vessels. *Scientific Reports* **8**, 1–6 (2018).
79. Tushingham, S., Snyder, C. M., Brownstein, K. J., Damitio, W. J. & Gang, D. R. Biomolecular archaeology reveals ancient origins of indigenous tobacco smoking in North American Plateau [Anthropology]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1–6** doi:10.1073/pnas.1813796115 (2018).
80. Blanco-Zubiaguirre, L. *et al.* GC–MS and HPLC-ESI-QToF characterization of organic lipid residues from ceramic vessels used by Basque whalers from 16th to 17th centuries. *Microchemical Journal* **137**, 190–203 (2018).
81. Zocatelli, R. *et al.* Fecal biomarker imprints as indicators of past human land uses: Source distinction and preservation potential in archaeological and natural archives. *Journal of Archaeological Science* **81**, 79–89 (2017).
82. Jerković, I., Marijanović, Z., Gugić, M. & Roje, M. Chemical profile of the organic residue from ancient amphora found in the adriatic sea determined by direct GC and GC-MS analysis. *Molecules* **16**, 7936–7948 (2011).
83. D’Anjou, R. M., Bradley, R. S., Balascio, N. L. & Finkelstein, D. B. Climate impacts on human settlement and agricultural activities in northern Norway revealed through sediment biogeochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 20332–20337 (2012).

84. M.Maffei. M. Maffei, Chemotaxonomic significance of leaf wax n-alkanes in the Umbelliferae, Cruciferae and Leguminosae (Subf. Papilionoideae). *Biochemical Systematics and Ecology* **24**, pp 531-545 (1996).
85. Dove, H. & Mayes, R. W. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: A review. *Australian Journal of Agricultural Research* **42**, 913–952 (1991).
86. Oliván, M., Ferreira, L. M. M., García, U., Celaya, R. & Osoro, K. Application of n-alkanes as diet composition markers in grazing/browsing goats and sheep: Effect of using different faecal recovery corrections and plant species grouping approaches. *Australian Journal of Agricultural Research* **58**, 1013–1022 (2007).
87. Mayes, R. W., Lamb, C. S. & Colgrove, P. M. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *Journal of Agricultural Science* **17**, 295–309 (1986).
88. Sistiaga, A., Mallol, C., Galván, B. & Summons, R. E. The Neanderthal meal: A new perspective using faecal biomarkers. *PLoS ONE* **9**, 6–11 (2014).
89. D’Anjou, R. M., Bradley, R. S., Balascio, N. L. & Finkelstein, D. B. Climate impacts on human settlement and agricultural activities in northern Norway revealed through sediment biogeochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 20332–20337 (2012).
90. Reshetnyak, V. I. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World Journal of Gastroenterology* **19**, 7341–7360 (2013).
91. Tyagi P, Edwards DR, C. M. (2008). Use of sterol and bile acid biomarkers to identify domesticated animal sources of fecal pollution. (2008).
92. Leeming, R., Ashbolt, N., Nichols, P. & Ball, A. Using Fecal Sterols From Humans and Animals to Distinguish Fecal Pollution in Receiving Waters. *Water Research* **30**, 2893–2900 (1996).
93. Matysik, S., Le Roy, C. I., Liebisch, G. & Claus, S. P. Metabolomics of fecal samples: A practical consideration. *Trends in Food Science and Technology* **57**, 244–255 (2016).
94. Evershed, R. P., Bethell, P. H., Reynolds, P. J. & Walsh, N. J. 5beta-Stigmastanol and Related 5beta-Stanols as Biomarkers of Manuring: Analysis of Modern Experimental Material and. *Journal of Archaeological Science* **24**, 485–495 (1997).

95. Derrien, M., Yang, L. & Hur, J. Lipid biomarkers and spectroscopic indices for identifying organic matter sources in aquatic environments: A review. *Water Research* **112**, 58–71 (2017).
96. Prost, K., Birk, J. J., Lehdorff, E., Gerlach, R. & Amelung, W. Steroid biomarkers revisited - Improved source identification of faecal remains in archaeological soil material. *PLoS ONE* **12**, 1–30 (2017).
97. Kögel-Knabner I. Analytical approaches for characterizing soil organic matter. *Organic Geochemistry* **31**, (2000).
98. Otto, A. & Simpson, M. J. Evaluation of CuO oxidation parameters for determining the source and stage of lignin degradation in soil. *Biogeochemistry* **80**, 121–142 (2006).
99. Thevenot, M., Dignac, M. F. & Rumpel, C. Fate of lignins in soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 1200–1211 (2010).
100. Sánchez, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* **27**, 185–194 (2009).
101. Himmel, M. E. *et al.* Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* **315**, 804–807 (2007).
102. Sánchez, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* **27**, 185–194 (2009).
103. Schmidt, M. W. I. *et al.* Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* **478**, 49–56 (2011).
104. Thevenot, M., Dignac, M. F. & Rumpel, C. Fate of lignins in soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 1200–1211 (2010).
105. Ruiz-Cortés, Z. T. Gonadal sex steroids: production, action and interactions in mammals. *Steroids - From Physiology to Clinical Medicine* **3–44** doi:10.5772/52994 (2012).
106. Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme, R. & Bamberg, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* **42**, 515–526 (1996).
107. Kumar, A. *et al.* Faecal steroid metabolites assay as a non-invasive monitoring of reproductive status in animals. *Veterinary World* **6**, 59–63 (2013).

108. Isobe, N., Nakao, T. & Shimada, M. Fecal Progesterone and Estrone During Pregnancy in a Giraffe: A Case Report. *Journal of Reproduction and Development* **53**, 159–164 (2007).
109. Shargal, D. *et al.* Fecal testosterone is elevated in high ranking female ibexes (*Capra nubiana*) and associated with increased aggression and a preponderance of male offspring. *Theriogenology* **69**, 673–680 (2008).
110. Schwarzenberger, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook* **41**, 52–74 (2007).
111. Goymann, W. On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: The problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. *Methods in Ecology and Evolution* **3**, 757–765 (2012).
112. Silliman, J. E., Meyers, P. A. & Bourbonniere, R. A. Record of postglacial organic matter delivery and burial in sediments of Lake Ontario. *Organic Geochemistry* **24**, 463–472 (1996).
113. Ortiz, J. E. *et al.* A 220 ka palaeoenvironmental reconstruction of the Fuentillejo maar lake record (Central Spain) using biomarker analysis. *Organic Geochemistry* **55**, 85–97 (2013).
114. Zheng, Y., Zhou, W., Meyers, P. A. & Xie, S. Lipid biomarkers in the Zoigê-Hongyuan peat deposit: Indicators of Holocene climate changes in West China. *Organic Geochemistry* **38**, 1927–1940 (2007).
115. Wang, Y. H. *et al.* Molecular biomarkers for sources of organic matter in lacustrine sediments in a subtropical lake in China. *Environmental Pollution* **176**, 284–291 (2013).
116. Nichols, P. D., Leeming, R., Rayner, M. S. & Latham, V. Use of capillary gas chromatography for measuring fecal-derived sterols - Application to stormwater, the sea-surface microlayer, beach greases, regional studies, and distinguishing algal blooms and human and non-human sources of sewage pollution. *Journal of Chromatography A* **733**, 497–509 (1996).
117. Quemeneur, M., Marty, Y., 1994. Fatty acids and sterols in domestic wastewaters. *Water Res* **28**, (5), 1217e1226. (1994).
118. Fattore, E., Benfenati, E., Marelli, R., Cools, E., Fanelli, R., 1996. Sterols in sediment samples from Venice lagoon, Italy. *Chemosphere* **33** (12), 2383e2393. (1996).

119. Grimalt, J. O., Fernández, P., Bayona, J. M. & Albaigés, J. Assessment of Faecal Sterols and Ketones as Indicators of Urban Sewage Inputs to Coastal Waters. *Environmental Science and Technology* **24**, 357–363 (1990).
120. Writer, J.H., Leenheer, J.A., Barber, L.B., Amy, G.L., Chapra, S.C., 1995. Sewage contamination in the upper Mississippi River as measured by the faecal sterol, coprostanol. *Water Research* **29**, (6), 1427e1436. (1995).
121. Mudge, S. M., Bebianno, M. J. A. F., East, J. A. & Barreira, L. A. Sterols in the Ria Formosa lagoon, Portugal. *Water Research* **33**, 1038–1048 (1999).
122. Venkatesan, M. I., Santiago, C. A., Physics, P. & Angeles, L. *BiOIOgy* **437**, (1989).
123. Jardé, E., Gruau, G. & Mansuy-Huault, L. Detection of manure-derived organic compounds in rivers draining agricultural areas of intensive manure spreading. *Applied Geochemistry* **22**, 1814–1824 (2007).
124. Gourmelon, M. *et al.* Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Research* **44**, 4812–4824 (2010).
125. Devane, M. L. *et al.* Identifying avian sources of faecal contamination using sterol analysis. *Environmental Monitoring and Assessment* **187**, (2015).
126. Gea, J. *et al.* Characterization of ancient lipids in prehistoric organic residues: Chemical evidence of livestock-pens in rock-shelters since early neolithic to bronze age. *Journal of Separation Science* **40**, 4549–4562 (2017).
127. Colin Renfrew, P. B. *Arqueología, teorías, métodos y prácticas*. (2011).
128. Coil, J., Korstanje, M. A., Archer, S. & Hastorf, C. A. Laboratory goals and considerations for multiple microfossil extraction in archaeology. *Journal of Archaeological Science* **30**, 991–1008 (2003).
129. Gill, F. L. *et al.* Archaeol - a biomarker for foregut fermentation in modern and ancient herbivorous mammals? *Organic Geochemistry* **41**, 467–472 (2010).
130. Birk, J. J., Dippold, M., Wiesenberg, G. L. B. & Glaser, B. Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1242**, 1–10 (2012).



131. Elhmmali, M. M., Roberts, D. J. & Evershed, R. P. Bile acids as a new class of sewage pollution indicator. *Environmental Science and Technology* **31**, 3663–3668 (1997).
132. Wu, J., Hu, R., Yue, J., Yang, Z. & Zhang, L. Determination of fecal sterols by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. *Journal of Chromatography A* **1216**, 1053–1058 (2009).
133. Sistiaga, A., Wrangham, R., Rothman, J. M. & Summons, R. E. New insights into the evolution of the human diet from faecal biomarker analysis in wild chimpanzee and gorilla faeces. *PLoS ONE* **10**, 15–17 (2015).
134. Battistel, D. *et al.* GC-MS method for determining faecal sterols as biomarkers of human and pastoral animal presence in freshwater sediments. *Analytical and bioanalytical chemistry* **407**, 8505–8514 (2015).
135. Birk, J. J., Dippold, M., Wiesenberg, G. L. B. & Glaser, B. Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1242**, 1–10 (2012).
136. Sistiaga, A., Berna, F., Laursen, R. & Goldberg, P. Steroidal biomarker analysis of a 14,000 years old putative human coprolite from Paisley Cave, Oregon. *Journal of Archaeological Science* **41**, 813–817 (2014).
137. Hong, Y.-J., Turowski, M., Lin, J.-T. & Yokoyama, W. H. Simultaneous characterization of bile acid, sterols, and determination of acylglycerides in feces from soluble cellulose-fed hamsters using HPLC with evaporative light-scattering detection and APCI-MS. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 9750–7 (2007).
138. Oliván, M., Osoro, K. & Martínez, M. J. Effect of temperature on alkanes extraction from faeces and pasture. *Proceedings of the 45th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Edinburgh* **184**, (1994).
139. Laredo, M. A., Simpson, G. D., Minson, D. J. & Orpin, C. G. The potential for using n-alkanes in tropical forages as a marker for the determination of dry matter by grazing ruminants. *The Journal of Agricultural Science* **117**, 355–361 (1991).
140. Vulich, S. A., O’riordan, E. G. & Hanrahan, J. P. Use of n-alkanes for the estimation of herbage intake in sheep: Accuracy and precision of the estimates. *The Journal of Agricultural Science* **116**, 319–323 (1991).

141. Wang, S., Liu, G., Zhang, J., Zhou, L. & Lam, P. K. S. An effective method for reconstructing the historical change in anthropogenic contribution to sedimentary organic matters in rivers. *Science of the Total Environment* **655**, 968–976 (2019).
142. Xia, G., Ji, C., Chen, L. & Yi, H. Biomarkers of the lower Jurassic black shale in the Shuanghu area of the Qiangtang basin, northern Tibet, and their geological significance. *Oil Shale* **34**, 55–69 (2017).
143. Wang, S., Liu, G., Yuan, Z. & Da, C. n-Alkanes in sediments from the Yellow River Estuary, China: Occurrence, sources and historical sedimentary record. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **150**, 199–206 (2018).
144. Ziegler, T. E. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. *Biology of Reproduction* **54**, 91–99 (1996).
145. Weltring, A., Schaebs, F. S., Perry, S. E. & Deschner, T. Simultaneous measurement of endogenous steroid hormones and their metabolites with LC-MS/MS in faeces of a New World primate species, *Cebus capucinus*. *Physiology and Behavior* **105**, 510–521 (2012).
146. Nielen, M. W. F. *et al.* The ultimate veal calf reference experiment: Hormone residue analysis data obtained by gas and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **586**, 30–34 (2007).
147. Tamburini, D., Łucejko, J. J., Modugno, F. & Colombini, M. P. Combined pyrolysis-based techniques to evaluate the state of preservation of archaeological wood in the presence of consolidating agents. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **122**, 429–441 (2016).
148. Tamburini, D., Łucejko, J. J., Ribechini, E. & Colombini, M. P. Snapshots of lignin oxidation and depolymerization in archaeological wood: An EGA-MS study. *Journal of Mass Spectrometry* **50**, 1103–1113 (2015).
149. Łucejko, J. J., Modugno, F., Colombini, M. P. & Zborowska, M. Archaeological wood from the Wieliczka Salt Mine Museum, Poland - Chemical analysis of wood degradation by Py(HMDS)-GC/MS. *Journal of Cultural Heritage* **13**, S50–S56 (2012).
150. Capelo, J.L., Mota, A.M., 2005. Ultrasonication for analytical chemistry. *Curr. Anal. Chem.* **1**, 193–201. 193–201 (2005).
151. Fitzgerald, N. Microwave Theory and Its Application to Spectrochemical

- 
- Analysis **40–43**, (2000).
152. Raman, G. & Gaikar, V. G. Microwave-Assisted Extraction of Piperine from *Piper nigrum*. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **41**, 2521–2528 (2002).
153. Wang, Y. H. *et al.* Molecular biomarkers for sources of organic matter in lacustrine sediments in a subtropical lake in China. *Environmental Pollution* **176**, 284–291 (2013).
154. Daniel R. Knapp. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions* **6–10**, (1978).
155. Orozco-Solano, M., Ruiz-Jiménez, J. & Luque de Castro, M. D. Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**, 1227–1235 (2010).
156. Sternbauer, L., Dieplinger, J., Buchberger, W. & Marosits, E. Determination of nucleating agents in plastic materials by GC/MS after microwave-assisted extraction with in situ microwave-assisted derivatization. *Talanta* **128**, 63–68 (2014).
157. Lerma-García, M. J., Simó-Alfonso, E. F., Méndez, A., Lliberia, J. L. & Herrero-Martínez, J. M. Fast separation and determination of sterols in vegetable oils by ultraperformance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 2771–2776 (2010).
158. Orbán, N., Kozák, I. O., Drávucz, M. & Kiss, A. LC-MS method development to evaluate major triterpenes in skins and cuticular waxes of grape berries. *International Journal of Food Science and Technology* **44**, 869–873 (2009).
159. Millán, L., Sampedro, M. C., Sanchez, A., Goicolea, M. A. & Barrio, R. J. Determination of phytosterols in oenological matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization and ion-trap mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis* **42**, 171–178 (2015).
160. Scripps Center for Metabolomics and Mass Spectrometry: Basic of Mass Spectrometry. [http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms\\_details.php](http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_details.php) Access date 03/04/2019.

161. Colombini, M. P. *et al.* A multi-analytical study of degradation of lignin in archaeological waterlogged wood. *Talanta* **80**, 61–70 (2009).
162. Mattonai, M., Watanabe, A., Shiono, A. & Ribechini, E. Degradation of wood by UV light: A study by EGA-MS and Py-GC/MS with on line irradiation system. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, doi:10.1016/j.jaap.2019.02.009 (2019).
163. Ribechini, E., Mangani, F. & Colombini, M. P. Chemical investigation of barks from broad-leaved tree species using EGA-MS and GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **114**, 235–242 (2015).
164. Kim, Y. M., Lee, H. W., Kim, S., Watanabe, C. & Park, Y. K. Non-Isothermal Pyrolysis of Citrus Unshiu Peel. *Bioenergy Research* **8**, 431–439 (2015).
165. Lucejko, J. J., Modugno, F., Ribechini, E., Tamburini, D. & Colombini, M. P. Analytical instrumental techniques to study archaeological wood degradation. *Applied Spectroscopy Reviews* **50**, 584–625 (2015).
166. Lucejko, J. J., Modugno, F., Ribechini, E. & del Río, J. C. Characterisation of archaeological waterlogged wood by pyrolytic and mass spectrometric techniques. *Analytica Chimica Acta* **654**, 26–34 (2009).
167. Tamburini, D., Lucejko, J. J., Modugno, F. & Colombini, M. P. Characterisation of archaeological waterlogged wood from Herculaneum by pyrolysis and mass spectrometry. *International Biodeterioration and Biodegradation* **86**, 142–149 (2014).
168. Fabbri, D. & Chiavari, G. Analytical pyrolysis of carbohydrates in the presence of hexamethyldisilazane. *Analytica Chimica Acta* **449**, 271–280 (2001).
169. Ribechini, E., Modugno, F., Colombini, M. P. & Evershed, R. P. Gas chromatographic and mass spectrometric investigations of organic residues from Roman glass unguentaria. *Journal of Chromatography A* **1183**, 158–169 (2008).
170. Andreotti, A., Bonaduce, I., Colombini, M. P., Modugno, F. & Ribechini, E. A diagnosis of the yellowing of the marble high reliefs and the black decorations in the chapel of the tomb of Saint Anthony (Padua, Italy). *International Journal of Mass Spectrometry* **284**, 123–130 (2009).

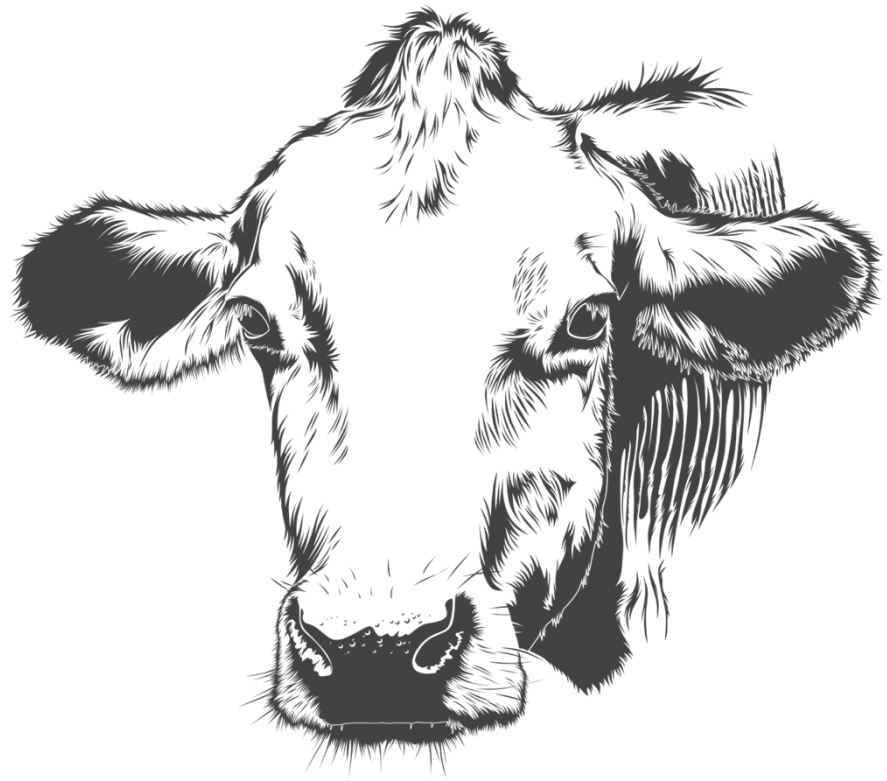
171. Bonaduce, I., Cito, M. & Colombini, M. P. The development of a gas chromatographic-mass spectrometric analytical procedure for the determination of lipids, proteins and resins in the same paint micro-sample avoiding interferences from inorganic media. *Journal of Chromatography A* **1216**, 5931–5939 (2009).
172. Mukarakate, C. *et al.* Influence of crystal allomorph and crystallinity on the products and behavior of cellulose during fast pyrolysis. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **4**, 4662–4674 (2016).
173. Mattonai, M., Licursi, D., Antonetti, C., Raspolli Galletti, A. M. & Ribechini, E. Py-GC/MS and HPLC-DAD characterization of hazelnut shell and cuticle: Insights into possible re-evaluation of waste biomass. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **127**, 321–328 (2017).
174. Tamburini, D. *et al.* Archaeological wood degradation at the site of Biskupin (Poland): Wet chemical analysis and evaluation of specific Py-GC/MS profiles. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **115**, 7–15 (2015).
175. Ohra-Aho, T., Gomes, F. J. B., Colodette, J. L. & Tamminen, T. S/G ratio and lignin structure among Eucalyptus hybrids determined by Py-GC/MS and nitrobenzene oxidation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **101**, 166–171 (2013).
176. Wang, S. *et al.* Comparison of the pyrolysis behavior of lignins from different tree species. *Biotechnology Advances* **27**, 562–567 (2009).
177. Azeez, A. M., Meier, D., Odermatt, J. & Willner, T. Fast pyrolysis of African and European lignocellulosic biomasses using Py-GC/MS and fluidized bed reactor. *Energy and Fuels* **24**, 2078–2085 (2010).
178. S.C. Moldoveanu. *Analytical Pyrolysis of Natural Organic Polymers* (1998)
179. Braovac, S. *et al.* Chemical analyses of extremely degraded wood using analytical pyrolysis and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Microchemical Journal* **124**, 368–379 (2016).
180. Tamburini, D., Łucejko, J. J., Ribechini, E. & Colombini, M. P. New markers of natural and anthropogenic chemical alteration of archaeological lignin revealed by in situ pyrolysis/silylation-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **118**, 249–258 (2016).

181. Shiono, A. *et al.* Thermoanalytical characterization of polymers: A comparative study between thermogravimetry and evolved gas analysis using a temperature-programmable pyrolyzer. *Polymer Testing* **42**, 54–61 (2015).
182. Carrero, J. A., Goienaga, N., Fdez-Ortiz de Vallejuelo, S., Arana, G. & Madariaga, J. M. Classification of archaeological pieces into their respective stratum by a chemometric model based on the soil concentration of 25 selected elements. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* **65**, 279–286 (2010).
183. Fermo, P., Delnevo, E., Lasagni, M., Polla, S. & de Vos, M. Application of chemical and chemometric analytical techniques to the study of ancient ceramics from Dougga (Tunisia). *Microchemical Journal* **88**, 150–159 (2008).
184. Nardella, F. *et al.* Chemical investigations of bitumen from Neolithic archaeological excavations in Italy by GC/MS combined with principal component analysis. *Analytical Methods* **11**, 1449–1459 (2019).
185. Cavalli, R. M., Licciardi, G. A. & Chanussot, J. Detection of anomalies produced by buried archaeological structures using nonlinear principal component analysis applied to airborne hyperspectral image. *IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing* **6**, 659–669 (2013).
186. Peres-Neto, P. R., Jackson, D. A. & Somers, K. M. How many principal components? stopping rules for determining the number of non-trivial axes revisited. *Computational Statistics and Data Analysis* **49**, 974–997 (2005).
187. Derde, M. P. & Massart, D. L. Supervised pattern recognition: the ideal method? *Analytica Chimica Acta* **191**, 1–16 (1986).
188. Wold, S. Pattern recognition by means of disjoint principal components models. *Pattern Recognition* **8**, 127–139 (1976).
189. Sáiz-Abajo, M. J., González-Sáiz, J. M. & Pizarro, C. Near infrared spectroscopy and pattern recognition methods applied to the classification of vinegar according to raw material and elaboration process. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **12**, 207–219 (2004).
190. Casale, M., Armanino, C., Casolino, C. & Forina, M. Combining information from headspace mass spectrometry and visible spectroscopy in the classification of the Ligurian olive oils. *Analytica Chimica Acta* **589**, 89–95 (2007).









---

## Chapter 2. Objectives



The animal domestication was most important events that ever happened in the human development, and in order to understand it, the archaeologist has been researching about the use of caves and rock-shelters as livestock-pens along time.

The main objective of this research work consists on characterize the biogenic origin of the organic sediments (*fumier* structure) found in rock-shelters and caves used as livestock-pen during Neolithic and Chalcolithic Age located in Cantabria (Araba/Álava, Spain) and Atapuerca mountain range (Burgos, Spain) and determine shepherds' activities carried out in them. For that purpose, two objectives were defined.

- Development different analytical methodologies for the determination of archaeological biomarkers in *facies* from *fumier* structures such as *n*-alkanes, sterols, phytosterol, bile acids, hormones and lignin and by means of GC-MS, HPLC-APCI-MS and Py-GC-MS or EGA-MS and use the concentrations obtained to determine uses along the years.
- The use of chemometric tools for the characterization of ancient lipids in prehistoric organic residues (*fumiens*) from San Cristobal and Los Husos I, II (Cantabria mountain range, Araba, Spain) and El Mirador cave (Atapuerca mountain range, Burgos, Spain), in order to determine the origin of those residues.





Chapter 3. Characterization of ancient lipids in  
prehistoric organic residues: a chemical evidence of  
livestock- pens in rock-shelters since early Neolithic  
to Bronze Age

---



### 3.1. INTRODUCTION

The settlement patterns maintained the same behaviour in the North of the Iberian Peninsula along the Early Neolithic and Bronze Age (Chalcolithic Age). One of these patterns was the use of caves and rock-shelters as livestock-pens<sup>1-4</sup>. Commonly and in order to reduce the volume of dung accumulated in the rock-shelter and clean it from parasites, the dung piles were burnt. The burning of these residues produced a type of archaeological sediment called *fumier* (dung in French). Therefore, *fumier* can be defined as archaeological sediment deriving from animal dung, typically burnt<sup>2,5,6</sup>. This sediment consist of, from top to bottom: i) burnt layer (ash white), ii) partially burnt layer (black colour) and iii) unburned layer (organic matter layer, brownish-reddish)<sup>2,7,8</sup>. The maximum temperatures reached during the piles burning differ from 450 °C to 800 °C, depending on humidity, air leak and dung's degradation level<sup>9</sup>. These temperatures correspond to ash white layers (totally burned). The black colour layers (partially burned) reached lower temperatures and even the unburned organic matter layer has a low intensity thermal impact<sup>9</sup>. The structure and formation of *fumiers* has been described previously<sup>3,5,9-11</sup>, however, the analysis of these layers for the identification of organic compounds in order determine the origin of those residues has not been done previously.

For that purpose, the identification of faecal biomarkers is a powerful tool. Evershed et al.<sup>12</sup> usefully defined the concept of archaeological biomarkers in 2008, having been increasing utilized since the 1980s, and during the last years, a relatively new field in archaeology has been developed, coming under the term *Biomolecular Archaeology*<sup>13,14</sup>. This concept includes different molecules such as DNA, proteins, carbohydrates and lipids. However, new research on archaeological biomarkers continues to focus on lipid compounds (sterols, bile acids and fatty acids) as a rich source of archaeological information. Those hydrophobic substances are not readily leached from their original deposition site due to their difficulty to dissolve in water and thus, they are highly stable for prolonged periods<sup>12-17</sup>.

Commonly, 5 $\beta$ -stanols and bile acids are studied in order to distinguish faeces from humans, pigs, canine or ruminants and determine their biogenic origin<sup>18,19</sup>. 5 $\beta$ -stanols have been usually used as faecal biomarkers due to their formation as reduction products of metabolic reduction of CHOL and phytosterols in the intestinal tract of the mammals.

On the other hand, the bile acids are a group of C<sub>24</sub>, C<sub>27</sub> and C<sub>28</sub> steroidal acids produced in the digestive system of animals. The bile acids can be divided in two different groups: the primary bile acids are formed from CHOL in the liver (chenodeoxycholic and cholic acids) and the secondary bile acids (lithocholic and deoxycholic acids) which are formed from the primary bile acids by the action of microorganisms<sup>18</sup>.

The “sterol fingerprint” of the faecal biomarkers for animals depends on the combination of three different factors; 1) animal diet, each diet has a different sterol profile due to the proportion of sterol precursors entering the digestive track, 2) endogenous sterols which are formed in different proportion in each animal and 3) anaerobic bacteria in the digestive tract that should biohydrogenate sterols to stanols in different ways<sup>20</sup>. Thus, Cop is only produced in the intestines of humans and it represents about 60% of the total sterol content in humans<sup>21,22</sup>. However, in the faeces of other animals, the relative quantity of Cop is generally much lower. In the case of ruminants, such as cows or sheep, their faeces have a higher relative proportion of Camp and Stigtanol due to the herbivorous high diet in Camp and Sit. Additionally, the faecal sterol profile of herbivores is dominated by C<sub>29</sub> sterols and the principal faecal sterols are 24-ethylcoprostanol, Sit and sito-stanol<sup>20</sup>. Therefore, the relation between some of these compounds can be used to distinguish the biogenic origin of the samples (Eq. 1).

$$\frac{\text{coprostanol} + \text{epicoprostanol}}{5\beta\text{-stigmastanol} + \text{epi-}5\beta\text{-stigmastanol}} \quad (\text{Eq. 1})$$

According to equation 1, if this value is higher than 1, the residue corresponds to humans, pig or canines and if it is lower than 1, the residue corresponds to ruminants<sup>18</sup>. Additionally, the dominant bile acid can corroborate the biogenic origin. For instance,



where Deox is dominant over Lit, the faecal residue corresponds to ruminants or canines, whereas where both deoxycholic and lithocholic acids are the dominant bile acids present, it corresponds to human faecal material. However, there is not a clear ratio for that domination considering that values with Deox/Lit 10:1 can correspond to human residues<sup>19</sup>. Therefore, the analysis of sterols and bile acids is the key to determine the origin of the faecal residues.

The extraction of these compounds from faecal samples has been commonly carried out using Soxhlet as extraction technique (24-36 h/sample)<sup>19,23-25</sup>. However, alternative extraction techniques such as ultrasound assisted solid-liquid extraction (20-80 min)<sup>26-29</sup> or pressurized liquid extraction<sup>30,31</sup> have been used in order to accelerate the extraction time and reduce the extraction solvent. Commonly, different mixtures of dichloromethane:methanol (DCM:MeOH;1:1, 2:1, 3:1 or 9:1) and volumes (20-200 mL)<sup>24,25,32,33</sup> have been used for the total lipid extraction (TLE). Afterwards, a hydrolysis of the compounds is necessary to obtain the free form of the target analytes. For that purpose, a saponification step is commonly used<sup>18,34</sup> prior to a liquid-liquid extraction (LLE) and a clean-up step (solid phase extraction, SPE) in order to eliminate interferences and separate the analytes. Sterols and bile acids can be separated by the LLE<sup>24,33</sup> or in the (SPE)<sup>24,30,35-37</sup> and they are analyzed separately by means of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) after a derivatization step.

All these methodologies are very time consuming (commonly higher than 48 h/sample), consume large volumes of solvent (commonly more than 200 mL/sample) and very tedious to carry out. Therefore, in this study, a new, robust and fast methodology based on a microwave assisted extraction (MAE)<sup>38</sup>, a clean-up step and GC-MS analysis is carried out for the determination of 8 sterols (Cop, EpiCop, CHOL, Col, Camp, Stigterol, Sit and Stiganol) and 2 bile acids (Lit and Deox) in each *fumier* layer. Twenty-five archaeological samples from San Cristobal's rock-shelter located in the North of Spain have been analyzed for that purpose.

## 3.2 EXPERIMENTAL

### 3.2.1 Chemical, reagents and reference standards

(3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-Cholestan-3-ol, (Col, 94,8%), (3 $\beta$ )-Cholest-5-en-3-ol (CHOL, 99 %), (3 $\beta$ ,5 $\beta$ )-Cholestan-3-ol (Cop, 98%), 5 $\beta$ -cholestan-3 $\alpha$ -ol (EpiCop, 95%), (3 $\beta$ )-Stigmast-5-en-3-ol (Sit, 95%), (3 $\beta$ ,24R)-Ergost-5-en-3-ol, (Camp, 65%), 3 $\beta$ -Hydroxy-24-ethyl-5,22-cholestadiene (Stigterol, 95% ), (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-Hydroxychohan-24-oic acid (Lit, 95%) and (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,12 $\alpha$ )-3,12-Dihydroxychohan-24-oic acid (Deox, 98%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), epi-5 $\beta$ -Stigmastanol (Stigtanol, 95%) was purchased from Chiron AS, Stikkestadveien 1, NO-7041 Trondheim, Norway, Isotopically labelled 5-cholesten-24(RS)-ethyl-3- $\beta$ -ol-25,26,26,26,17,27,27-d<sub>7</sub> ([<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-Sit, 98%) was purchased from C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Canada). Cholesterol-25,26,26,26,27,27,27-d<sub>7</sub> ([<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-CHOL, 98%) and Lithocholic acid-2,2,3,4,4-d<sub>5</sub> ([<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Lit, 98%) were purchased from Sigma-Aldrich. All the isotopically labelled compounds were used as surrogate.

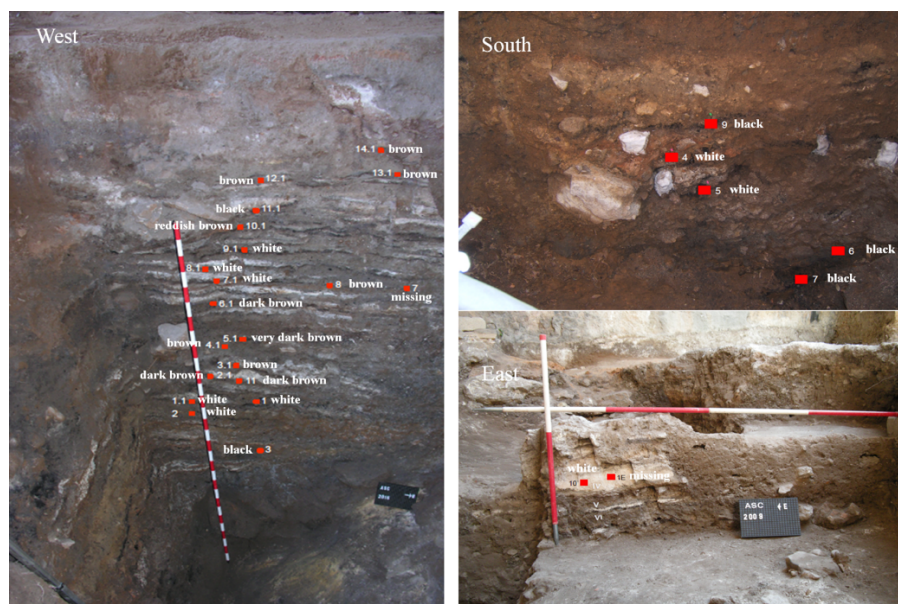
All organic solvents (ultratrace GC degree), acetone, MeOH, *n*-hexane, ethyl acetate (EtOAc) and DCM were supplied by Scharlab (Barcelona, Spain). KOH (85%) and HCl (37%) were supplied by Scharlab and Fisher Scientific (Loughborough, UK), respectively. SPE cartridges used for the clean-up step (Agilent Bond Elut-HF Mega BE-SI, 2 g, 12 ml) were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, California, USA). Pyridine and N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) used as derivatization solvent and reagent respectively, were supplied by Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma-Aldrich, respectively. Ultra-high purity water obtained from tap water pre-treated by Elix reverse osmosis and subsequent filtration by a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA) was used in the saponification step and for cleaning.

### 3.2.2 Sampling and sample storage

San Cristobal's rock-shelter is located in the south side of the Cantabria mountain range, Araba, North of Spain (UTM 30 N. ETRS 89: 531844; 4716246). The rock-shelter has 13 prehistoric archaeological levels since antique Neolithic to Bronze Age, and one level from historic period between XV and XVI (AD) century. This site was used as animal-pen and since the late XV century as a hermitage. In the same geographic area, there are located other 5 rock-shelters such as Los Husos I and II, Peña Larga, Peña Parida and Balanciego and an archaeological site of 8 dolmens of the same prehistoric ages<sup>1</sup>.

Twenty-five samples were collected horizontally from different *fumiers* (see Figure 3.1) using a drill (Makita DDF453 18-volt LXT, Anjo, Japan) coupled to a core (20 cm length, 1.5 cm inner diameter). Commonly, samples 5-10 cm in length were obtained. Nine ash white (on top layer and totally burnt), 5 black (layer in the middle and partially burnt) and 11 brownish samples (underneath layer and non-burnt) were removed (see Figure 3.1) according to the experience of archaeologist along all the strata of the excavation.

All the samples were transported in a zip-bag at 4 °C to the laboratory and maintained at -82°C until their analysis. Previous to the analysis, all the samples were crushed with a pestle and mortar, dried at 90 °C in an *oven* for 12 h and sieved until 60 µm particle size fraction.



**Figure 3.1** San Cristobal rock-shelter site General view of West, South and East sections showing the archaeological sequence and location of samples collected for chemistry analysis (red squares). Corresponding colour of sediments has been detailed.

### 3.2.3 Microwave assisted extraction

100 g of the sieved samples were weighed into the microwave vessels. 100 and 50 ng of the deuterated analogues were added to each sample and 25 mL of a mixture of DCM:MeOH (2:1, v/v). The extraction was carried out in a microwave oven (MAE, CEM Mars 5, Matthews, NC, USA) increasing the temperature to 150 °C in 10 min and maintained for 10 min. Other microwave parameters such as the power and the stir bar agitation were fixed at 1600 W and intermediate agitation, respectively. After the extraction, the extract was centrifuged for 5 min at 10,000 rpm and finally, the supernatant was removed. The solution was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen prior to the saponification.

### 3.2.4 Saponification step

This procedure is based on the method used by Elhmmali et al.<sup>39</sup> with some modifications. Briefly, the dried extract was dissolved in 5 mL of 2M KOH (MeOH:H<sub>2</sub>O, 10:1, v/v) and it was kept in an oven for 1 h at 120°C.

### 3.2.5 Liquid-liquid extraction, clean-up and derivatization step

Liquid-liquid extraction was slightly modified from Grimalt<sup>40</sup> et al. 5 mL of an HCl:H<sub>2</sub>O solution (2 M) was added to the saponificated solution for acidifying the solution (pH ≤ 2) and the sterols and bile acids were extracted with DCM (2x10 mL). The 20 mL of the extract was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The dryness extract was reconstituted in 1.5 mL of EtOAc. Silica cartridge was preconditioned with 10 mL MeOH, acetone, *n*-hexane and EtOAc previous to the charge. Sterols and bile acids were eluted with 40 mL of acetone. Those 40 mL were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and derivatized with a mixture of 125  $\mu$ L of pyridine and 25  $\mu$ L of BSTFA at 70 °C for 1h in an oven. That mixture was directly analyzed.

### 3.2.6 Instrumental analysis

A 7890 GC system coupled to a 5973 inert mass-selective detector (qMS), both of Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) was provided with a HP 5MS column (60m x 0.25mm, 0.25 $\mu$ m) from Agilent. Helium was used as carrier gas at 1.5 mL min<sup>-1</sup>. 2  $\mu$ L of the derivatized extract were injected in the *splitless* mode (2 min) at 300 °C. The GC oven temperature programme was as follows: 180 °C was maintained for 5 min, and then the temperature was increased at 2°C min<sup>-1</sup> to 300°C and maintained for 7 min. The qMS transfer line temperature was maintained at 300 °C, and the ion source and quadrupole at 230 °C and 150 °C, respectively. Sterols and bile acids were analyzed simultaneously.

Measurements were performed both in the scan (50–525  $m/z$ ) and in the SIM (Selected Ion Monitoring) modes. The  $m/z$  values monitored for each analyte were the following: Cop (370/215), EpiCop (370/355), [ $^2\text{H}_7$ ]-CHOL (336/375), CHOL (329/368), Col (215/445), Camp (343/382), Stigterol (255/484), Stiganol (215/473), [ $^2\text{H}_7$ ]-Sit (364/403), Sit (357/396), Lit (257/430), [ $^2\text{H}_5$ ]-Lit (220/435) and Deox (255/428). The first ion was used as quantifier and the second one as qualifier.

### 3.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.3.1 Optimization of the clean-up step

SPE is a useful technique to eliminate interferences from sediments extracts<sup>41</sup>. For that purpose, native silica based SPE cartridges was chosen according to literature<sup>19,24</sup>. The column was preconditioned with 10 mL of MeOH, acetone and *n*-hexane. Afterwards, and in order to determine which solvent was suitable to extract the target analytes, a solvent profile of 4 different solvents (*n*-hexane, DCM, acetone and MeOH) was carried out. 1.5 mL of EtOAc were fortified with 150 ng of each analyte. Five fractions of 4 mL (20 mL) of each solvent were added to independent cartridges each time. All the obtained fractions were analysed by GC-MS after the derivatization step. *n*-Hexane and DCM did not elute the analytes in an adequate way so both were discharged as elution solvents. 20 mL of acetone were enough to elute the sterols and 20 mL of MeOH to elute all the target analytes (data not shown). However, the use of MeOH as elution solvent was less efficient for sample clean-up. Thus, another solvent profile was done, just with acetone and acquiring fractions of 4 mL to 40 mL. 20 mL were enough to elute all the sterols and 40 mL to elute all the bile acids. Thus, 40 mL were chosen as optimum solvent volume to elute both analyte families.

Good recoveries were obtained for all target compounds (82-100%) using 40 mL of acetone as eluting solvent and repeatability was always below 5%.

### 3.3.2 Optimization of the microwave assisted extraction

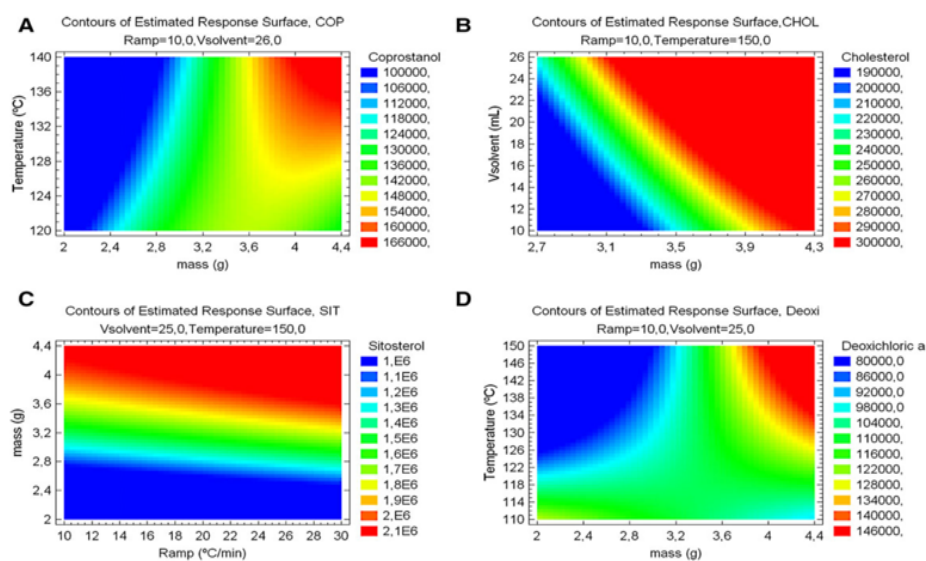
Commonly, Soxhlet extraction was used to extract sterols and bile acids from sediments and soils<sup>15,23,39,41</sup>. However, the large extraction time and the high amount of solvent used in Soxhlet makes this technique too time consuming and not too respectable with the environment. In this study, the optimization of a microwave assisted extraction has been carried out in order to reduce extraction time and the amount of solvent. A real sample with all the analytes were used for the optimization of the MW parameters. The presence of all the target analytes were ensured after the analysis of the sample. DCM:MeOH (2:1, v/v) solvent mixture was used as extraction solvent according to the literature<sup>19,24</sup>.

Four variables, i.e. ramp temperature (RT, 10-25 min), sample mass (M, 2-5 g), solvent volume (V, 10-26 mL) and final temperature (T, 110-150 °C), were optimized by means of a central composite design (Statgraphics Centurion XV software, Statgraphics, Madrid, Spain), in order to obtain the response surface of each analyte.

The data was fitted to Equation (2), where Y is the response, X<sub>A</sub>, X<sub>B</sub>, X<sub>C</sub> and X<sub>D</sub> corresponds to RT, M, V and T, respectively, and B<sub>i</sub>, B<sub>ij</sub> and B<sub>ii</sub> are the fitting parameters.

$$Y = B_0 + B_A X_A + B_B X_B + B_C X_C + B_D X_D + B_{AB} X_A X_B + B_{AC} X_A X_C + B_{AD} X_A X_D + B_{BC} X_B X_C + B_{BD} X_B X_D + B_{CD} X_C X_D + B_{AA} X_A^2 + B_{BB} X_B^2 + B_{CC} X_C^2 + B_{DD} X_D^2 \quad \text{Eq. 2}$$

B-coefficients with a p-value lower than 0.05 were considered as significant (Table 3.1) and were further used in order to build the response surface (Figure 3.2). All the responses are summarized in the Table 3.2.



**Figure 3.2** Response surface of (A) coprostanol (Cop), (B) cholesterol (CHOL), (C) sitostanol (Sit), and (D) deoxicholic acid (Deox) obtained from MAE central composite design. Significant variables are illustrated for each analyte.

**Table 3.1:** Significant variables according to their  $p$ -value  $< 0.05$ .

Analytes	RT (min, A)	M (g, B)	V (mL, C)	T (°C, D)	AB	AC	AD	BC	BD	CD	AA	BB	CC	DD
Cop	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.
EpiCop	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.
CHOL	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	+	n.s.	-	n.s.	n.s.
Col	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.
Camp	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.
Stigterol	n.s.	+	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.
Sit	+	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.
Stigtanol	n.s.	+	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.
Lit	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Deox	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.



**Table 3.2** Central composite design responses (area) of each experiment and analyte.

Oven ramp (°C/min)	Sample mass (g)	Solvent Volume (mL)	Temperature (°C)	Cop	EpiCop	CHOL	Col	Camp	Lit	Stigterol	Deox	Sit	Stigتانول
25	27.699	22	140	102029	116890	205162	17166	361674	59974	115803	86432	1358616	127968
15	27.314	14	120	106399	111115	232633	16129	272621	37972	85057	81634	949449	96982
15	42.916	14	120	128809	147666	223033	18559	407281	52526	125210	81097	1415874	135012
15	43.208	22	120	120216	131481	229417	18161	389763	59923	121700	84300	1387473	134686
20	50.122	18	130	129698	146955	239196	20004	462695	59383	148310	152463	1661492	159525
25	42.886	14	120	156487	174560	270900	22022	501954	65152	151104	132836	1744283	165414
25	27.638	22	120	113577	129628	195428	16581	334274	44930	99386	98950	1118038	111434
20	35.276	18	130	129657	149816	285668	20236	448955	56123	138702	151493	1584331	156275
25	27.588	14	140	84267	92647	157795	13282	286326	27529	89059	66343	1013235	99897
15	42.712	22	140	203055	220740	312248	24742	593549	73479	176793	161751	2031163	191949
15	27.678	14	140	100913	115471	200780	16320	348756	36031	108455	80465	1230906	121077
25	42.509	22	140	181663	226329	415315	26547	625201	64919	196636	145182	2318542	208170
25	2.765	14	120	142651	151402	253863	19913	396896	44053	117881	113576	1325622	131000
15	27.638	22	120	133822	144232	162089	14175	276099	37238	71217	108654	782991	83287
25	42.752	22	120	142610	153732	204548	16463	414693	43273	127279	121907	1446269	140578
20	35.468	18	110	142306	156812	234183	19787	462891	49206	145779	112342	1644429	164178
20	35.161	26	130	142170	152124	249117	20842	489583	43740	156103	126009	1811497	171924
25	43.064	14	140	183236	197126	296753	24259	577431	43222	181991	139400	2045006	195277
15	42.932	14	140	146917	157416	300606	21361	493001	41571	156015	112903	1769394	171264
20	3.527	18	130	144792	157730	283920	20823	489168	43666	155414	119265	1762961	168681
20	34.983	18	130	143396	154963	238868	18825	429754	32613	130130	91233	1477909	143932
10	35.067	18	130	172985	186587	326234	23457	505361	47679	154611	122082	1775427	173002
20	35.097	18	150	135107	150835	269880	21229	500103	45418	160371	128159	1842503	177794
30	35.457	18	130	146369	170477	258218	19693	488034	37058	153871	85127	1813426	171320
20	3.512	18	130	138234	151382	221422	18577	440807	34939	134735	89442	15235593	153440
20	20.084	18	130	60313	65974	107959	8842	184607	15650	55442	31220	626270	62963
15	2.773	22	140	70542	81506	140546	10978	243937	21275	76287	56184	895918	86944

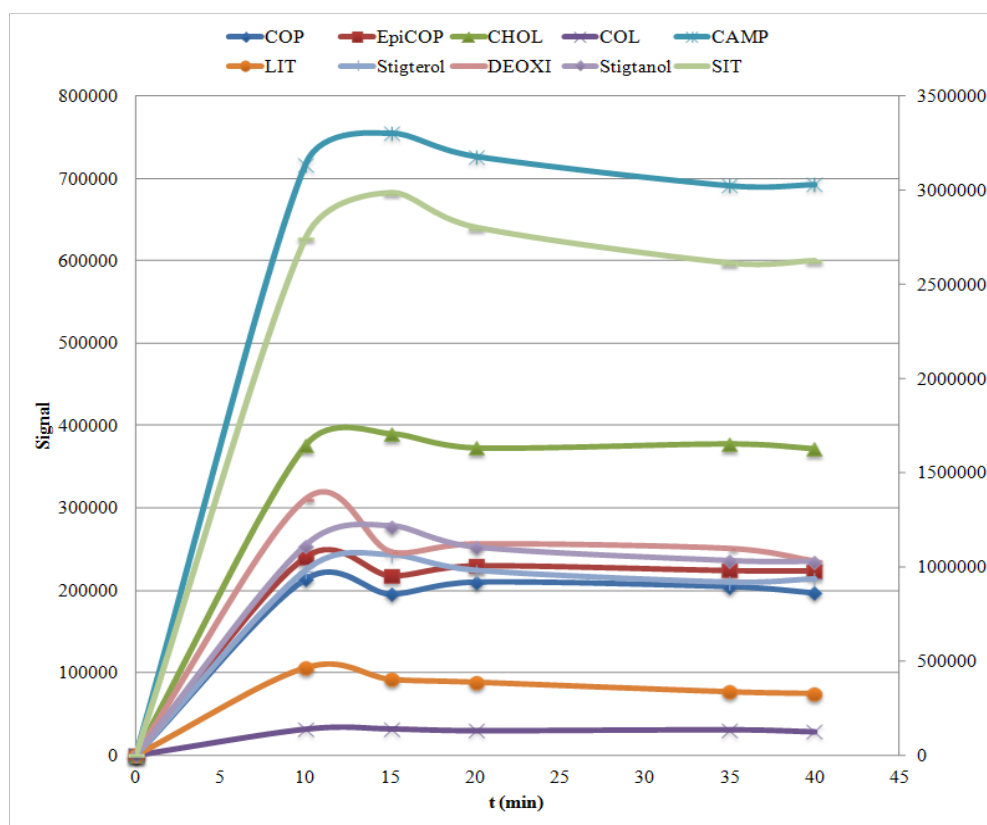
All sterols, except for CHOL and Sit, showed the same behaviour. As it is illustrated in Figure 3.2A, highest values were obtained at high temperature and with the highest amount of sample. In the case of CHOL (Figure 3.2B), interaction between V and T was also significant. As it is observed in Figure 3.2B, highest values were obtained at high M and V values. If V vs T is illustrated, similar behaviour was observed at high M, however, at low mass the behaviour was just the opposite. Nevertheless, in that latter case, the signal decreased 3 times comparing to the former.

In the case of Sit, the ramp was also significant. However, at high M, the ramp was not significant even it was higher at high values (Figure 3.2C).

Finally, in the case of bile acids, M was just significant for Lit and Deox behaviour was similar to that observed in sterols. For both, highest values were obtained at highest M and highest T (Figure 3.2D).

Considering all these parameters, highest V (25 mL), highest M (5 g), highest T (150 °C) and the fastest RT (30 °C/min) were fixed as the best conditions for the extraction of sterols and bile acids by MAE.

Finally, a time profile was carried out maintaining the fixed values from 10 min to 40 min in order to determine the best extraction time for these compounds. As it is illustrated in Figure 3.3, no significant differences were observed and 10 min were chosen in order to minimize the extraction time. Therefore, 20 min were enough for the extraction of sterols and bile acids. This methodology is faster than those obtained from literature where commonly Soxhlet (24 – 36 h) is used as extraction technique or repeated ultrasonic extractions (80-90 min) (Table 3.4).



**Figure 3.3.** Extraction time (min) profile for microwave assisted extraction after obtaining the optimum conditions.

**Table 3.4:** Resume and comparison of the methodologies found in literature for the analysis of sterols and bile acids from solid samples. Relative Standard Deviation (%RSD) and Limit of Detection (LODs).

Sample	Analytes	Extraction technique and solvent	Hydrolysis	Clean-ups	Derivatization	Analysis	%Recoveries	%RSD	LODs (ng/g)	[Ref]
Archaeological sediments (5 g)	Sterols	4 x ultrasound energy (20 min) DCM/MeOH (3:1 v/v) at 40°C	-	-	BSTFA	GC-MS	-	<5	-	Sistiaga, 2014 <sup>26</sup>
Faecal samples (0.5-1 g)	Sterols	3 x ultrasound energy (30 min) DCM/MeOH (3:1 v/v)	Saponification 5mL of 2 N sodium hydroxide in 90% methanol to the TLE by heating at 100°C for 1 hour.	LLE	BSTFA (60 °C, 30 min)	GC-MS	-	-	-	Sistiaga, 2015 <sup>25</sup>
Surface sediments (1 g)	Sterols	PLE 20 mL DCM (150 °; 1,500 psi)	-	SPE (70 mL DCM)	BSTFA (70°C for 1 h)	GC-MS	89.4-110.3	2.7-14.3	6-10,1	Battistel, 2015 <sup>30</sup>
Faecal and archaeological soils 100 mg-10 g	Sterols and bile acids	PLE DCM:MeOH (2:1 and 1:3 v/v) (100°C, 5 min heating time, 5 min static time and 3 cycles)	Saponification 3.5 mL 5%KOH in MeOH. 12-14 h	LLE (fractionation of bile acids and sterols) and SPE each fraction	Sterols (HMDS, 70°C for 1 h) Bile acids (BSTFA, 80°C for 1 h)	2 analysis (sterols and bile acids) GC-MS	52-102	13-44	2-5 (LOQ)	Prost, 2017 <sup>31</sup>
Archaeological soils (5 g)	Sterols and bile acids	MAE 25ml of a mixture of DCM:MeOH (2:1, v/v) 20 min	5ml of 2M KOH (MeOH:Milli-Q, 10:1, v/v)	LLE and SPE	BSTFA (70°C for 1 h)	Single GC-MS	81.8-145	mar-14	1.5-33 (LOQ)	This work

Table 3.4 (continuation).

Sample	Analytes	Extraction technique and solvent	Hydrolysis	Clean-ups	Derivatization	Analysis	%Recoveries	%RSD	LODs (ng/g)	[Ref]
Archaeological sediments (5 g)	Sterols	4 x ultrasound energy (20 min) DCM/MeOH (3:1 v/v) at 40°C	-	-	BSTFA	GC-MS	-	<5	-	Sistiaga, 2014 <sup>26</sup>
Faecal samples (0.5-1 g)	Sterols	3 x ultrasound energy (30 min) DCM/MeOH (3:1 v/v)	Saponification 5 mL of 2 N sodium hydroxide in 90% methanol to the TLE by heating at 100°C for 1 hour.	LLE	BSTFA (60 °C, 30 min)	GC-MS	-	-	-	Sistiaga, 2015 <sup>29</sup>
Surface sediments (1 g)	Sterols	PLE 20 mL DCM (150 °; 1,500 psi)	-	SPE (70 mL DCM)	BSTFA (70°C for 1 h)	GC-MS	89.4-110.3	2.7-14.3	6-10,1	Battistel, 2015 <sup>30</sup>
Faecal and archaeological soils 100 mg-10 g	Sterols and bile acids	PLE DCM:MeOH (2:1 and 1:3 v/v) (100°C, 5 min heating time, 5 min static time and 3 cycles)	Saponification 3.5 mL 5%KOH in MeOH. 12-14 h	LLE (fractionation of bile acids and sterols) and SPE each fraction	Sterols (HMDS, 70°C for 1 h) Bile acids (BSTFA, 80°C for 1 h)	2 analysis (sterols and bile acids) GC-MS	52-102	13-44	2-5 (LOQ)	Prost, 2017 <sup>31</sup>
Archaeological soils (5 g)	Sterols and bile acids	MAE 25ml of a mixture of DCM:MeOH (2:1, v/v) 20 min	5ml of 2M KOH (MeOH:Milli-Q, 10:1, v/v)	LLE and SPE	BSTFA (70°C for 1 h)	Single GC-MS	81.8-145	mar-14	1.5-33 (LOQ)	This work

### 3.3.3 Quality parameters of the developed method

The recoveries of the method were determined using addition standard methodology. The impossibility of obtaining blanks without target compounds made addition standard the unique way to calculate the recoveries. For that purpose, first of all, an estimation of the concentration of the analytes in the blanks was calculated. EpiCop and Cop were at 0.4 ng/g concentration levels, Deox at 2 ng/g, Col, Camp, Stigterol, Lit and Stig-tanol at 15 ng/g level, Sit and CHOL at 125 ng/g level. Taking into account those concentrations, the blanks were fortified 5 times and 25 times at higher concentrations. The concentration of the blanks and the fortified samples were determined by triplicate. Finally, for each analyte, the concentration found was compared with the concentration spiked ( $\text{Conc.}_{\text{Spiked}}$  vs  $\text{Conc.}_{\text{Found}}$ ). The recoveries were obtained from the slope of those graphics. As it is observed in Table 3.5, good recoveries were obtained for all the target compounds (73%-121%). The precision of the method was calculated using the standard deviation of the slope. The relative standard deviation (%RSD) of the repeatability was below 14% (see Table 3.5). Besides, the precision of the method was also calculated using replicates ( $n=3$ ) of the real samples and in all the cases the %RSD values were below 14%. Table 3.5: Quality parameters of the method. Correlation coefficient, linear range (ng/ $\mu\text{L}$ ), limits of quantification (LOQs, ng/g), Recovery (%) and repeatability ( $n=3$ , %).

**Table 3.5:** Quality parameters of the method. Correlation coefficient, linear range (ng/ $\mu$ L), limits of quantification (LOQs, ng/g), Recovery (%) and repeatability (n=3, %).

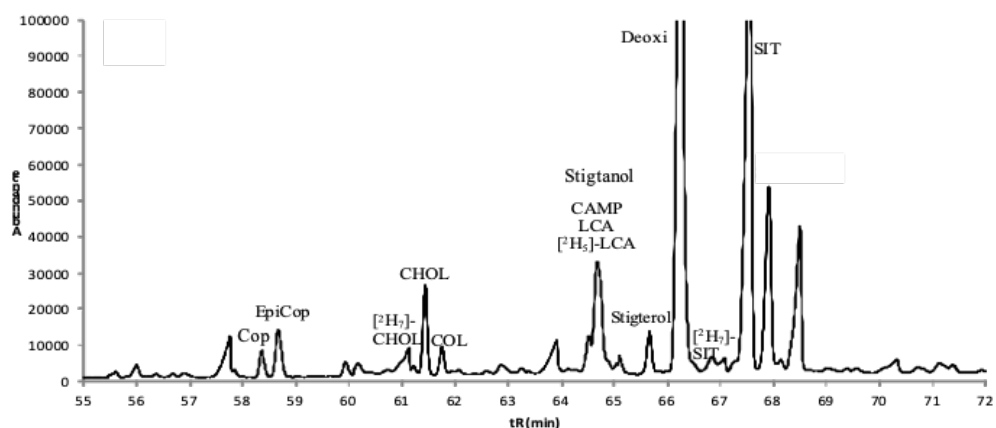
Analytes	Correlation coefficient	Linear range (ng/ $\mu$ L)	LOQs (ng/g)	Recovery %	Repeatability (% RSD)
<b>Cop</b>	0.9991	0.1-12	5.7	88	8%
<b>EpiCop</b>	0.9991	0.1-12	3.2	98	4%
<b>CHOL</b>	0.9991	0.1-12	25.4	74	11%
<b>Col</b>	0.9990	0.1-12	11.6	95	4%
<b>Camp</b>	0.9991	0.1-12	1.5	82	8%
<b>Stigterol</b>	0.9995	0.1-12	3.9	85	8%
<b>Sit</b>	0.9993	0.1-12	33.0	82	7%
<b>Stigtanol</b>	0.9993	0.1-12	23.0	99	3%
<b>Lit</b>	0.9946	0.1-24	8.4	82	6%
<b>Deox</b>	0.9998	0.1-24	13.6	121	14%

Matrix effect was calculated spiking 150 ng of the surrogates in the blank soil (n=3) and in the 25 mL of the MW extract solvent (n=3). Isotopically labelled compounds were used for this purpose due to the impossibility of obtaining a real blank. The optimized method was applied to these samples and the ratio between the blank soil recovery and the solvent recovery was used to determine the matrix effect. Ratios of 0.82, 0.81 and 0.93 were obtained for [ $^2\text{H}_7$ ]-CHOL, [ $^2\text{H}_7$ ]-Sit and [ $^2\text{H}_5$ ]-Lit respectively. Therefore, little influence from the matrix is observed in the method which is corrected using the surrogates.

Linear regression equations were obtained by plotting the peak area/IS area versus the analyte concentration, and correlation coefficients were always above 0.995.

Finally, limits of quantification (LOQs) were calculated. For that purpose and due to the difficulty to obtain blanks without analytes, the LOQs were calculated with the signals obtained from the whole procedure but without sample. LOQs were estimated as the signal average of 4 blanks plus 10 times the standard deviation of the signal (S+10s). As it is observed in Table 3.4, all the LOQs were at ng/g levels.

Those quality parameters are similar to those obtained from literature (Table 3.4). Figure 3.4 shows a chromatogram corresponding to a real sample.



**Figure 3.4** Chromatogram corresponding to the real sample M12.1

### 3.3.4 Application to real sample from San Cristobal site and biogenic characterization of the samples

Twenty-five soil samples from different *fumier* layers located at San Cristobal site, Cantabria mountain range, Araba (North of Spain) were analyzed (Figure 3.1). All the results obtained are summarized in Table 3.6.

According to the Equation 3.1; M3, M4.1, M10.1, M12.1 and M13.1 showed ruminant residues (Table 3.6). In order to use this equation and ensure the ruminant residue, the presence of Cop, EpiCop, CHOL and Stigtanol is necessary. However, the high presence of Deox in some strata, such as M8, M6.1, M5.1, M3.1, M2.1, M11, M9, M6 and M7 make us to think about the possibility of being ruminant residue although Cop or EpiCop were not present (see Table 3.7). Moreover, Deox/Lit ratios lower than 10:1 suggest a possible human residue<sup>19</sup>, thus, this possibility has been taken into account (Table 3.6) due to the hermitage use of the rock-shelter. Importantly, Cop can be epimerized in the soil over time so the presence of either EpiCop or Cop could be enough to determine the origin of the soil<sup>18,31,42-44</sup>. On the other hand, the presence of Stigtanol suggests an origin from ruminant. In this way, and in order to determine the biogenic origin of these



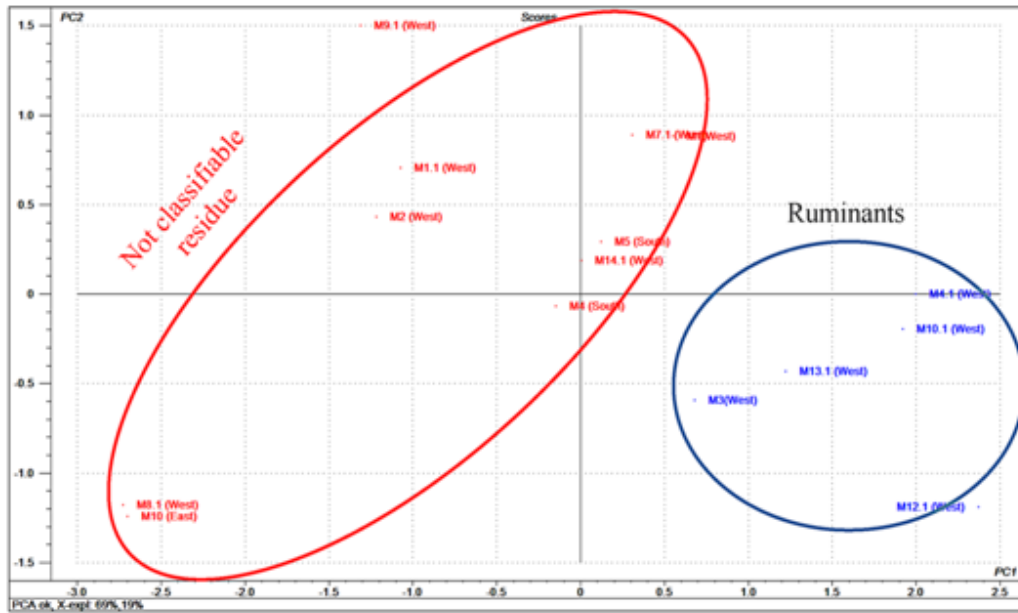
strata, a SIMCA (*Soft independent modelling by class analogy*) classification was proposed. For that purpose, a principal component analysis (PCA) was built with all ruminants' (M3, M4.1, M10.1, M12.1 and M13.1) and not classifiable residues (M10, M14.1, M9.1, M8.1, M7.1, M11, M1, M2, M4, M5) according to Eq. 3.1 (Figure 3.5) and the logarithmic concentration of 5 variables (Cop, EpiCop, Stiganol, Lit and Deox). Afterwards, two models with not classifiable residues and ruminant samples were built and finally, the possible ruminants' samples were classified. That way, with a confidence level of 95%, M8, M6.1, M5.1, M3.1, M2.1, M11, M9, M6 and M7 correspond to ruminants' residues (Table 3.6). This model was not able to classify M11.1 sample. However, this sample corresponds to the separation between the stable site and the shepherd site so this sample could be altered. In this way, the absence of Cop or EpiCop could be attributed to the transformation of one isomer to another due to time (diagenesis) and not to the absence of ruminants' residues<sup>18,31,42-44</sup>. Thus, the presence either Cop or EpiCop is enough to use in Eq. 3.2. On the other hand, the use of Deox and Lit abundances or ratios alone for the characterization of the residues is discarded and both sterols and bile acids families are necessary for an appropriate characterization of the residues.

**Table 3.6** Age, samples order by date, concentrations (ng/g), classification with different equations and SIMCA classification and colour of the sample.

Age	Sample	ng/g				Deox	(Eq 3.1) (Cop+EpiCop)/Stig tanol	(Eq 3.2) Cop or EpiCop/Stigtanol	(Eq 3.3) Deox/Lti	After SIMCA classification	Sample colour
		Cop	EpiCop	Stigtanol	Lit						
Chalcolithic	M10 (East)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	84	< LOQ	not classifiable residue	not classifiable residue	not classifiable residue	not classifiable residue	white
	M14.1 (West)	< LOQ	< LOQ	59	66	375	not classifiable residue	not classifiable residue	ruminant, canine or human (5.7)	not classifiable residue	brown
	M13.1 (West)	7	15	234	67	824	ruminant (0.093)	ruminant (0.093)	ruminant or canine (12.3)	ruminant	brown
	M12.1 (West)	28	97	1312	271	1397	ruminant (0.095)	ruminant (0.095)	ruminant, canine or human (5.2)	ruminant	brown
	M11.1 (West)	< LOQ	13	89	75	< LOQ	not classifiable residue	possible ruminant (0.147)	not classifiable residue	not classified	black
	M10.1 (West)	7	40	265	171	4711	ruminant (0.179)	ruminant (0.179)	ruminant or canine (27.5)	ruminant	reddish brown
	M9.1 (West)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	564	not classifiable residue	not classifiable residue	ruminant or canine	not classifiable residue	white
	M8.1 (West)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	56	< LOQ	not classifiable residue	not classifiable residue	not classifiable residue	not classifiable residue	white
	M7.1 (West)	< LOQ	< LOQ	42	32	2044	not classifiable residue	not classifiable residue	ruminant or canine (64.6)	not classifiable residue	white
	M8 (West)	< LOQ	19	83	48	2380	not classifiable residue	possible ruminant (0.230)	ruminant or canine (49.6)	ruminant	brown
	M6.1 (West)	< LOQ	8	163	98	4522	not classifiable residue	possible ruminant (0.046)	ruminant or canine (45.9)	ruminant	dark brown
	M5.1 (West)	< LOQ	7	104	63	3034	not classifiable residue	possible ruminant (0.071)	ruminant or canine (47.9)	ruminant	very dark brown

Table 3.6 (Continuation)

Age	Sample	ng/g						(Eq 3.1) (Cop+EpiCop)/Stigstanol	(Eq 3.2) Cop or EpiCop/Stigstanol	(Eq 3.3) Deox/Lti	After SIMCA classification	Sample colour
		Cop	EpiCop	Stigstanol	Lit	Deox						
Early Neolithic	M4.1 (West)	14	11	326	211	7220	ruminant (0.078)	ruminant (0.078)	ruminant or canine (34.2)	ruminant	brown	
	M3.1 (West)	15	< LOQ	50	223	1363	not classifiable residue	possible ruminant (0.295)	ruminant or canine (6.1)	ruminant	brown	
	M2.1 (West)	< LOQ	7	29	45	2550	not classifiable residue	possible ruminant (0.242)	ruminant or canine (57.0)	ruminant	dark brown	
	M11 (West)	< LOQ	24	100	63	1922	not classifiable residue	possible ruminant (0.235)	ruminant or canine (30.5)	ruminant	dark brown	
	M1.1 (West)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	100	462	not classifiable residue	not classifiable residue	ruminant, canine or human (4.6)	not classifiable residue	white	
	M1 (West)	< LOQ	< LOQ	46	96	3566	not classifiable residue	not classifiable residue	ruminant or canine (37.3)	not classifiable residue	white	
	M2 (West)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	149	241	not classifiable residue	not classifiable residue	ruminant, canine or human (1.6)	not classifiable residue	white	
	M3 (West)	11	5	104	120	332	ruminant (0.158)	ruminant (0.158)	ruminant, canine or human (2.7)	ruminant	black	
	M9 (South)	< LOQ	20	73	25	1130	not classifiable residue	possible ruminant (0.272)	ruminant or canine (44.9)	ruminant	black	
	M4 (South)	< LOQ	< LOQ	35	250	268	not classifiable residue	not classifiable residue	ruminant, canine or human (1.1)	not classifiable residue	white	
	M5 (South)	< LOQ	< LOQ	38	187	732	not classifiable residue	not classifiable residue	ruminant, canine or human (3.9)	not classifiable residue	white	
	M6 (South)	< LOQ	15	74	130	519	not classifiable residue	possible ruminant (0.208)	ruminant, canine or human (4.0)	ruminant	black	
	M7 (South)	< LOQ	43	114	82	1489	not classifiable residue	possible ruminant (0.373)	ruminant or canine (18.2)	ruminant	black	



**Figure 3.5.** Principal component analysis for ruminant and nonclassifiable residues samples according to Eq (3.1) (Table 3.6) and the logarithmic concentration values of coprostanol, epi-coprostanol, stigmastanol, lithocolic acid, and deoxicholic acid. PC2 (19%) versus PC1 (69%) is illustrated.

Notably, the prehistoric age levels (Table 3.7 for samples data details) show a recurrent use of the site as an animal-pen for more than 2000 years of activity. Three are the main periods of activity are observed: one from 3990±40 BP (4530-4410 cal. BP) to 4100±40 BP (4820-4750/4730-4510/4470-4450 cal. BP), the second from 4470±40 BP (5300-4970 cal. BP) to 5490±30 BP (6310-6275/6230-6220 cal. BP) and the third from 5880±30 BP (6775-6765/6750-6645 cal. BP) to 6010±30 BP (6940-6780/6765-6755 cal. BP). Between the stabling periods, there is a period without ruminant evidence. The data table shows <sup>45</sup> a period of time between the late Neolithic and bell-shaped level where the use of rock-shelters as animal-pens decrease in the area (samples M9.2, M8.1, M7.1). San Cristobal is the only rock-shelter in the area where some herding activity is observed <sup>8</sup>. In the rest of the rock-shelters studied in the Cantabria mountain range, a funeral use is observed in that period, the same as in the dolmens of the area or Las Yurdinas II rock-

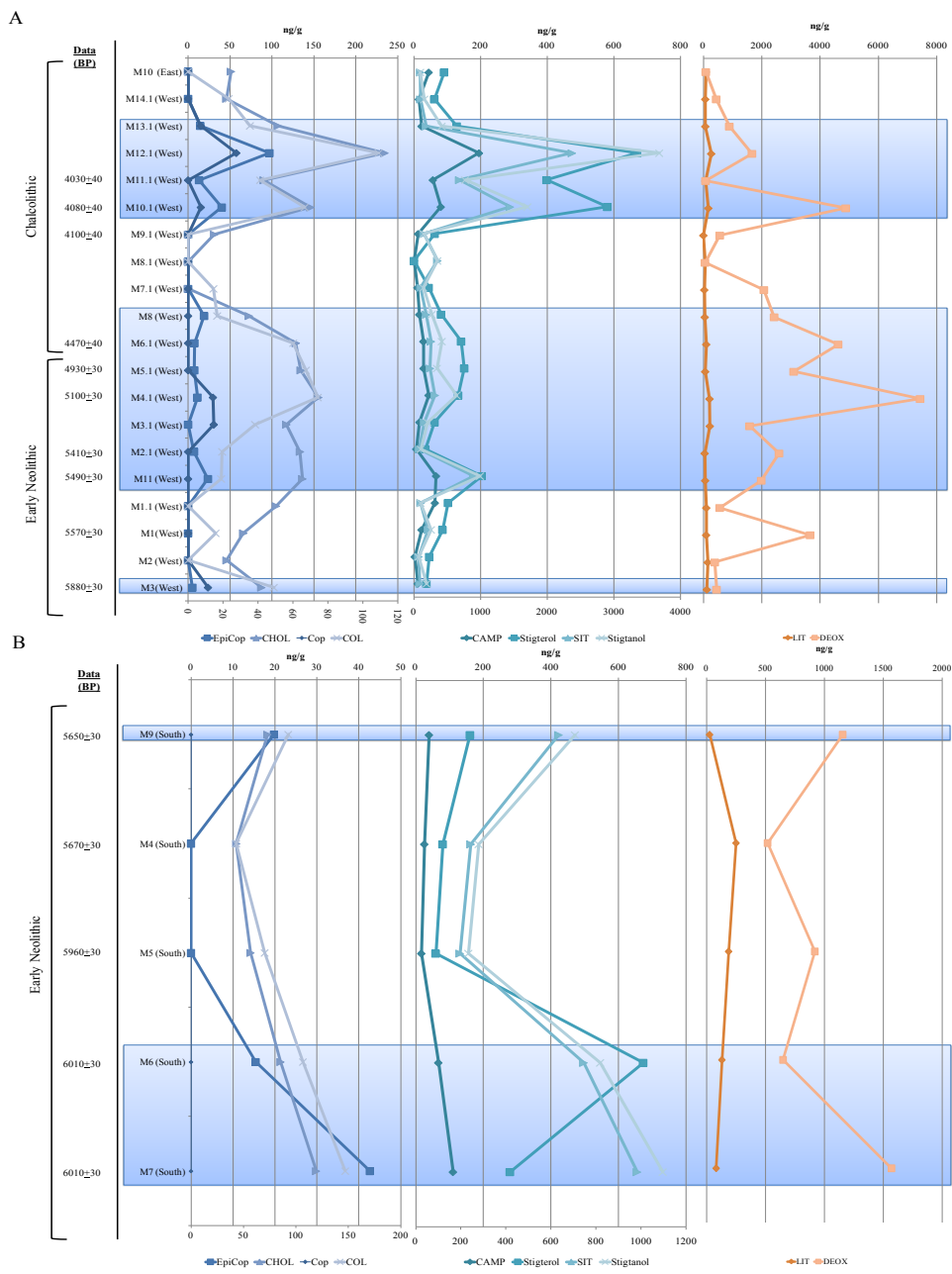
shelter (meridional watershed of the area)<sup>6,7</sup>. During the excavation of San Cristobal site, the *fumier* deposits levels continued in those levels so its use as an animal-pen was proposed. The absence of organic compounds in the white layers and the absence of brown and black layers (absence of ruminant evidence) apparently questioned the preliminary hypothesis. Thus, it could be concluded that similar to other rock-shelters of the area, along that period of time, San Cristobal rock-shelter could not be used as an animal-pen. This evidence could suggest a conflict period among the different communities settled in the area. However, micromorphological characterization of the sediments accumulated during that stage of Chalcolithic have provided direct evidence of recurrent herbivore corralling at the site<sup>8</sup>.

**Table 3.7:** Radiocarbon dates from San Cristóbal samples<sup>45</sup>.

Archaeol. Level	Sample	Lab. Ident.	BP.	Cal. BC. (2 $\sigma$ )	Cal. BP. (2 $\sigma$ )
II		Beta-52435	3990±40	2580-2460	4530-4410
IV	M.11.1	Beta-252437	4030±40	2830-2820 /2630-2470	4780-4770/4580-4420
V	M.10.1	Beta-268468	4080±40	2860-2800/2750- 2710/2710-2550	4810-4750/4700- 4660/4660-4500
VI	M.9.1 W	Beta-268470	4100±40	2870-2800/2780- 2560/2520-2500	4820-4750/4730- 4510/4470-4450
VIII	M.6.1. W	Beta-288941	4470±40	3350-3020	5300-4970
IX	M.5.1W	Beta-310013	4930±30	3770-3650	5720-5600
X	M.4.1W	Beta-307800	5100±30	3970-3890/3880-3800	5920-5840/5830-5750
XI	M.2.1W	Beta-337631	5410±30	4340-4230	6290-6180
XII	M.11W	Beta-373277	5490±30	4360-4325/4280-4270	6310-6275/6230-6220
XIII	M.1W	Beta-391721	5570±30	4490-4355	6440-6305
XIII	M.9S	Beta-391719	5650±30	4540-4445/4415-4405	6490-6395/6365-6355
XIII	M.4S	Beta-391720	5670±30	4545-4450	6495-6400
XIII	M.3W	Beta-421295	5880±30	4825-4815/4800-4695	6775-6765/6750-6645
XIII	M.5S	Beta-421296	5960±30	4930-4780	6880-6730
XIII Inf	M.7S/M .6S	Beta-423461	6010±30	4990-4830/4815-4805	6940-6780/6765-6755

Twenty-five samples were collected equally from different *fumiers* and different combustion layers (white, brownish and black). Fourteen samples were identified from different Neolithic periods between 6010±30 BP (6940-6780/6765-6755 cal. BP, data obtained from samples M6 and M7 South) and 4930±30 BP (5720-5600 cal. BP, data obtained from sample M5.1 West). The rest correspond to Chalcolithic periods dated between 4470 ± 40 BP (5300-4970 cal. BP, sample M6.1 West) and 4030±40 BP (4780-4770/4580-4420 cal. BP, sample M11.1) (Figure 3.1 and 3.6 )<sup>45</sup>. Nine of the Early Neolithic samples gave positive in ruminant. All of them are either brownish or black layer samples which correspond to cattle bed (unburned) and partially burned layers of the *fumiers* respectively. On the other hand, the 5 samples where no evidence of ruminant is

observed correspond to the white ash layers (burnt samples). The same distribution is observed in the 11 Chalcolithic samples except for M14.1 West sample. This sample correspond to a brownish layer, however, this location is opened to a collective grave dating from XVI century, which could have altered the biomolecular preservation of the sample. Taking that into account, the M11.1 sample, which is not classified in the model, could be included in the ruminant samples due to its black colour and presence of EpiCop at lower concentration than Stigtanol in the sample. Thus, the brownish and the black layers are the target samples for being analyzed in the future due to the information obtained from them. On the other hand, when the objective is the identification of the residue, white layers could be not analyzed. The characterization of these white layers using sterol and phytosterol is quite difficult in this scenario due to the absence of Cop, EpiCop and Stigtanol (or low concentration) in all the white samples. Furthermore, these layers indicative of burning can absorb the compounds leaching from layers above due to its composition which could explain the existence of some compounds in some of the white layers <sup>46,47</sup>.



**Figure 3.6:** Illustration of the concentration obtained in every stratum dated and squared the ruminant residues. (A) East and west side and (B) south side.



### **3.4 CONCLUSIONS**

The characterization of prehistoric species from their organic residues is receiving greater attention in archaeology. The analysis of sterols and bile acids can provide a powerful biomarker approach making species identification possible. For that purpose, in this work, the simultaneous determination of eight 5 $\beta$ -sterols (Cop, EpiCop, CHOL, Camp, Stigterol, Sit, Stigtanol) and two bile acids (Lit and Deox) has been carried out optimizing the extraction step by MW and the clean-up steps. Thus, the time-consuming extraction and clean-up has been reduced considerably, compared to those used in the literature, in addition to reducing the solvent volume used. Furthermore, this methodology has been successfully used for the characterization of *fumiens* from San Cristobal site. Ruminants have been detected in all brownish and black layers while white layers always give negative results.

Moreover, the use of the site as animal-pen has been confirmed during three long periods. The study also observed the absence or lower accumulation of ruminant residues during a stage of the Chalcolithic Period, which agrees with a possible conflict period in the area suggested by other studies published in this area. This is the first piece of research where these kinds of samples have been successfully characterized.

### 3.5 BIBLIOGRAPHY

1. Fernández-Eraso, J. *et al.* Beginnings, settlement and consolidation of the production economy in the Basque region. *Quaternary International* **364**, 162–171 (2015).
2. Angelucci, D. E. *et al.* Shepherds and karst: the use of caves and rock-shelters in the Mediterranean region during the Neolithic. *World Archaeology* **41**, 191–214 (2009).
3. Vergès, J. M. *et al.* El Mirador cave (Sierra de Atapuerca, Burgos, Spain): A whole perspective. *Quaternary International* **414**, 236–243 (2016).
4. Carrancho, Herrejón Lagunilla & Vergès, J. M. Three archaeomagnetic applications of archaeological interest to the study of burnt anthropogenic cave sediments. *Quaternary International* **414**, 244–257 (2016).
5. Martín-Rodríguez, P. & Vergès, J. M. Bone alterations in fumiers: Experimental approach. *Quaternary International* **414**, 294–303 (2016).
6. Díaz, A. P. & Eraso, J. F. Same anthropogenic activity, different taphonomic processes: A comparison of deposits from Los Husos I & II (Upper Ebro Basin, Spain). *Quaternary International* **214**, 82–97 (2010).
7. Fernández-Eraso, J. & Polo Díaz, A. Establos en abrigos bajo roca de la Prehistoria Reciente: su formación, caracterización y proceso de estudio. Los casos de Los Husos y de San Cristóbal. *Krei* **10**, 39–51 (2008).
8. Polo-Díaz, A. *et al.* Management of residues and natural resources at San Cristóbal rock-shelter: Contribution to the characterisation of chalcolithic agropastoral groups in the Iberian Peninsula. *Quaternary International* **414**, 202–225 (2016).
9. Vergès, J. M. *et al.* The Mas del Pepet experimental programme for the study of prehistoric livestock practices: Preliminary data from dung burning. *Quaternary International* **414**, 304–315 (2016).
10. Mallol, C. *et al.* The black layer of Middle Palaeolithic combustion structures. Interpretation and archaeostratigraphic implications. *Journal of Archaeological Science* **40**, 2515–2537 (2013).

11. Expósito, I. & Burjachs, F. Taphonomic approach to the palynological record of burnt and unburnt samples from El Mirador Cave (Sierra de Atapuerca, Burgos, Spain). *Quaternary International* **414**, 258–271 (2016).
12. Evershed, R. P. Organic residue analysis in archaeology: The archaeological biomarker revolution. *Archaeometry* **50**, 895–924 (2008).
13. Wells, E. C. Biomolecular Archaeology: Definition. in *Encyclopedia of Global Archaeology* (ed. Smith, C.) 910–911 (Springer New York, 2014). doi:10.1007/978-1-4419-0465-2\_362
14. Brown, T. A. & Brown, K. *Biomolecular Archaeology: An Introduction*. (Wiley-Blackwell, 2011).
15. Bull, I. D., Betancourt, P. P. & Evershed, R. P. Chemical evidence supporting the existence of a structured agricultural manuring regime on Pseira Island, Crete during the Minoan Age. *Aegaeum* **20**, 69–75 (1999).
16. Evershed, R. P. & Bethell, P. H. Application of multimolecular biomarker techniques to the identification of fecal material in archaeological soils and sediments. *Archaeological chemistry: organic, inorganic, and biochemical analysis* 157–172 (1996). doi:10.1021/bk-1996-0625.ch013
17. Medeiros, P. M. & Simoneit, B. R. T. Gas chromatography coupled to mass spectrometry for analyses of organic compounds and biomarkers as tracers for geological, environmental, and forensic research. *Journal of Separation Science* **30**, 1516–1536 (2007).
18. Bull, I. D., Lockheart, M. J., Elhmmali, M. M., Roberts, D. J. & Evershed, R. P. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environment International* **27**, 647–654 (2002).
19. Bull, I. D., Elhmmali, M. M., Roberts, D. J. & Evershed, R. P. The application of steroidal biomarkers to track the abandonment of a Roman wastewater course at the Agora (Athens, Greece). *Archaeometry* **45**, 149–161 (2003).
20. Ball, A. Using Faecal Sterols From Humans and Animals To Distinguish Faecal Pollution in Receiving Waters. *Water Research* **30**, 2893–2900 (1996).
21. Eneroth, P., Hellstroem, K. & Ryhage, R. Identification and Quantification of Neutral Fecal Steroids By Gas-Liquid Chromatography and Mass Spectrometry: Studies of Human Excretion During Two Dietary Regimens. *Journal of lipid research* **5**, 245–262 (1964).

22. Eyssen, H. J., Parmentier, G. G., Compennolle, F. C., De Pauw, G. & Piessens-Denef, M. Biohydrogenation of sterols by *Eubacterium* ATCC21,408-Nova species. *European Journal of Biochemistry* **36**, 411–421 (1973).
23. Gill, F. L. *et al.* Archaeol - a biomarker for foregut fermentation in modern and ancient herbivorous mammals? *Organic Geochemistry* **41**, 467–472 (2010).
24. Birk, J. J., Dippold, M., Wiesenberg, G. L. B. & Glaser, B. Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1242**, 1–10 (2012).
25. Naeher, S. *et al.* Tracing the methane cycle with lipid biomarkers in Lake Rotsee (Switzerland). *Organic Geochemistry* **66**, 174–181 (2014).
26. Sistiaga, A., Mallol, C., Galván, B. & Summons, R. E. The Neanderthal meal: A new perspective using faecal biomarkers. *PLoS ONE* **9**, 6–11 (2014).
27. Burger, P., Charrié-Duhaut, A., Connan, J., Flecker, M. & Albrecht, P. Archaeological resinous samples from Asian wrecks: Taxonomic characterization by GC-MS. *Analytica Chimica Acta* **648**, 85–97 (2009).
28. Copley, M. S., Bland, H. a, Rose, P., Horton, M. & Evershed, R. P. Gas chromatographic, mass spectrometric and stable carbon isotopic investigations of organic residues of plant oils and animal fats employed as illuminants in archaeological lamps from Egypt. *The Analyst* **130**, 860–871 (2005).
29. Sistiaga, A., Wrangham, R., Rothman, J. M. & Summons, R. E. New insights into the evolution of the human diet from faecal biomarker analysis in wild chimpanzee and gorilla faeces. *PLoS ONE* **10**, 15–17 (2015).
30. Battistel, D. *et al.* GC-MS method for determining faecal sterols as biomarkers of human and pastoral animal presence in freshwater sediments. *Analytical and bio-analytical chemistry* **407**, 8505–8514 (2015).
31. Prost, K., Birk, J. J., Lehndorff, E., Gerlach, R. & Amelung, W. Steroid biomarkers revisited - Improved source identification of faecal remains in archaeological soil material. *PLoS ONE* **12**, 1–30 (2017).
32. Spangenberg, J. E., Ferrer, M., Jacomet, S., Bleicher, N. & Schibler, J. Molecular and isotopic characterization of lipids staining bone and antler tools in the Late Neolithic settlement, Zurich Opera Parking, Switzerland. *Organic Geochemistry* **69**, 11–25 (2014).

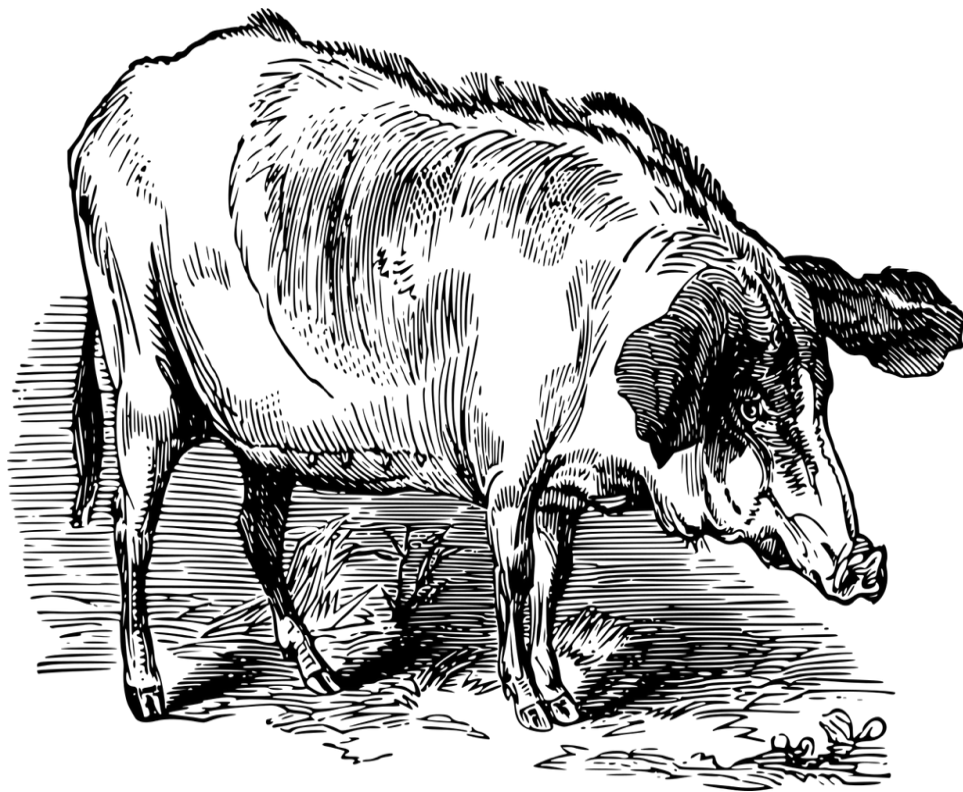
33. Bechtel, A. & Schubert, C. J. A biogeochemical study of sediments from the eutrophic Lake Lugano and the oligotrophic Lake Brienz, Switzerland. *Organic Geochemistry* **40**, 1100–1114 (2009).
34. Mendiara, I., Domeño, C. & Nerín, C. Development of a fast sample treatment for the analysis of free and bonded sterols in human serum by LC-MS. *Journal of Separation Science* **35**, 3308–3316 (2012).
35. Wu, J., Hu, R., Yue, J., Yang, Z. & Zhang, L. Determination of fecal sterols by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. *Journal of Chromatography A* **1216**, 1053–1058 (2009).
36. Cunha, S. S., Fernandes, J. O. & Oliveira, M. B. P. P. Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1128**, 220–227 (2006).
37. Xiang, L. W., Liu, Y., Li, H. F. & Lin, J. M. Simultaneous extraction and determination of free and conjugated phytosterols in tobacco. *Journal of Separation Science* **39**, 2466–2473 (2016).
38. Medina, A. L. *et al.* Rapid microwave assisted extraction of meat lipids. *Food Research International* **78**, 124–130 (2015).
39. Elhmmali, M. M., Roberts, D. J. & Evershed, R. P. Bile acids as a new class of sewage pollution indicator. *Environmental Science and Technology* **31**, 3663–3668 (1997).
40. Grimalt, J. O., Fernández, P., Bayona, J. M. & Albaigés, J. Assessment of Fecal Sterols and Ketones as Indicators of Urban Sewage Inputs to Coastal Waters. *Environmental Science and Technology* **24**, 357–363 (1990).
41. Shah, V. K. G., Dunstan, H. & Taylor, W. An efficient diethyl ether-based soxhlet protocol to quantify faecal sterols from catchment waters. *Journal of Chromatography A* **1108**, 111–115 (2006).
42. McCalley, D. V., Cooke, M. & Nickless, G. Effect of sewage treatment on faecal sterols. *Water Research* **15**, 1019–1025 (1981).
43. Pratt, C., Warnken, J., Leeming, R., Arthur, M. J. & Grice, D. I. Degradation and responses of coprostanol and selected sterol biomarkers in sediments to a simulated major sewage pollution event: A microcosm experiment under sub-tropical estuarine conditions. *Organic Geochemistry* **39**, 353–369 (2008).

44. Bartlett, P. D. Degradation of coprostanol in an experimental system. *Marine Pollution Bulletin* **18**, 27–29 (1987).
45. Fernández-Eraso, J. & Mujika-Alustiza, J. A. La estación Megalítica de la Rioja Alavesa: Cronología, Orígenes y Ciclos de utilización. *ZEPHYRVS, Revista de Prehistoria y Arqueología* **71**, 89–106 (2013).
46. Guo, Y., Zhao, C., Chen, X. & Li, C. CO<sub>2</sub> capture and sorbent regeneration performances of some wood ash materials. *Applied Energy* **137**, 26–36 (2015).
47. Wang, Y., Huang, L. & Lau, R. Conversion of municipal solid waste incineration bottom ash to sorbent material for pollutants removal from water. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **60**, 275–286 (2016).









Chapter 4. Combined quantification of sex hormones,  
bile acids and sterols in fumier samples from Los  
Husos I and Los Husos II

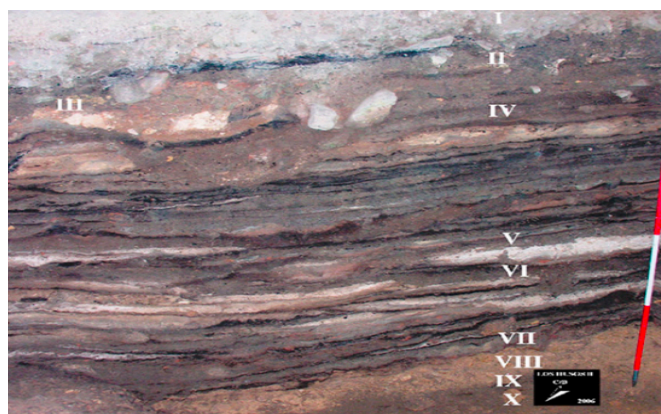
---



#### 4.1 INTRODUCTION

Archaeological and genetic studies have proved that approximately 12,000 years ago hunter-gatherers from the Fertile Crescent became sedentaries and began to cultivate plants and domesticate animals. This transition known as Neolithic Revolution was expanded through the Mediterranean Basin <sup>1-4</sup>. In that context, from the Neolithic through to the Bronze Age shepherds started using caves and rock-shelters as seasonal pens for their livestock <sup>5</sup>.

Many factors have contributed to the preservation of *fumiers* (Figure 4.1) all over the years <sup>6</sup>. Moreover, taking into account that organic matter and therefore its composition can survive in soils and sediments under favourable conditions, it could be a source of information regarding to ancient farming practices and behaviours <sup>7,8</sup>. One of the strategies in order to obtain information from those *facies* is the study of biomarkers in general and faecal biomarkers in particular.



**Figure 4.1.** *Fumier* located at Los Husos II. It is formed of fine sub-horizontal facies organized in alternations of burnt, partially burnt and unburnt layers. Picture taken from Los Husos II <sup>9</sup>

Both, sterols and bile acids, belong to a biggest group of biologically active organic compounds composed of seventeen carbon atoms bonded in four-fused rings

(steroid core). They differ on the functional group attached to this steroid core. While the former contains a hydroxyl group, the latter is carboxylated<sup>10,11</sup>. Although sterols can be naturally found in plants, animals and fungi, some bacteria can also synthesize them. Three major factors contribute to outstanding differences in its content in vertebrate faeces. The first one is the diet. Animals have different diets; therefore, sterol precursors entering the bowels also differ<sup>12</sup>. In addition, diet influences gut microbiota composition that in turn metabolises sterols into 5 $\beta$ -stanols in diverse isomeric configurations<sup>13</sup>. Finally, they can be endogenously synthesized in different proportions depending on its metabolic pathways. Therefore, overall, the combination of those three factors leads to a “sterol fingerprint” capable of differentiating animal species.

Ruminant faeces show a higher percentage of 29-C phytosterols ( $\beta$ -Sit, Camp and Stigtanol) derived from an herbivorous diet. On the other hand, omnivore faeces present a higher rate of 27-C sterols (Cop, EpiCop, and Col)<sup>14</sup>. More precisely, 5 $\beta$ -Stigtanol is the most representative stanol of ruminants, whereas Cop is distinctive of humans, pigs and canines<sup>15</sup>.

Two are the ratios proposed to distinguish faecal biogenic origin. According to Eq. 3.4, when the value is lower than 1, the dung corresponds to ruminants, whereas when is higher than 1, it belongs to omnivores<sup>16</sup>. On the other hand, according to Eq. 3.5, if the value is lowest than 29% the sample correspond to ruminants, when the values is between 29-65% and there is also ursodeoxycholic acid it belongs to porcine; and finally, if the value is higher than 65% it correspond to humans<sup>17</sup>.

$$\frac{Cop + EpiCop}{Stigtanol + EpiStigtanol} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

$$\frac{Cop}{Cop + Stigtanol} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.5})$$

Bile acids are also faecal biomarkers from vertebrate animals; however, its composition differs significantly between species. They are synthesized in the liver as

primary bile acids, stored in the gall-bladder and secreted into the intestinal lumen. Its functions are to emulsify fats, increase lipase activity, maintain cholesterol levels stable and help lipid absorption. Besides, once in the gut, they are metabolized into secondary bile acids by the action of the intestinal microbiota and the vast majority is reabsorbed. Just a small percentage (~5%) is excreted<sup>13,18</sup>. Nevertheless, it is enough for faecal source assignment. Ruminant show a biggest percentage of Deox, omnivores present more Lit and Urso is specific from pigs<sup>19</sup>. As a result, it has been established that when Deox is ten times bigger or more than Lit, the sample belongs to herbivores<sup>16</sup>(Eq. 3.3)

$$\frac{\text{Deox}}{\text{Lit}} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

All these faecal biomarkers are related with the diet so they are not useful to identify shepherds' practices according to herd distribution. One possibility is that females in gestation period and new-borns could be separated from the rest of the herd to keep them under control and not lost them. In order to study that behaviour, sex hormones (androgens, oestrogens and progestins) could be an alternative due to their similarity with sterols and bile acids. Even though they have never been analysed for archaeological purposes, their faecal metabolites have been used to gather information about oestrous cycle, pregnancy, abortion, puberty and reproductive behaviour in farm, wild and zoo animals<sup>20-22</sup>. This is possible because faecal hormone concentration truly correlates with serum fluctuations<sup>23</sup>. The main androgen, testosterone (TT), show seasonality and social dominance in males. Oestrogens (estriol (E3), 17 $\beta$ -estradiol (E2) and estrone (E1)) are primary female sex hormones and high peaks confirm pregnancy. Finally, progesterone (PG) is the main hormone in females and it is involved in menstruation cycle, pregnancy and embryogenesis. In contrast to other sex hormones that are excreted through bile, faeces and urine inalterable, PG can be metabolized into 5 $\alpha$  and 5 $\beta$  pregnanes before its excretion<sup>21</sup> although it is detected at high concentrations in faeces and urine<sup>24,25</sup>.

So far, no standard methodology for the analysis of sterols, bile acids and sex hormones altogether from soil samples has been developed. Traditionally, sterols and bile acids have been extracted using organic solvents, such as methanol/dichloromethane

or chloroform/methanol, via Soxhlet or by sonication<sup>26</sup>. Afterwards, total lipid fraction is concentrated and saponified. Then, the saponified extracts are separated by a liquid-liquid extraction into a neutral and an acidic fraction that respectively includes sterols and bile acids; and a further cleaned up using solid phase extraction cartridges is commonly performed. Finally, both fractions are derivatised and analysed by means of gas-chromatography mass-spectrometry<sup>18,19,26,27</sup>. On the other hand, sex hormones are extracted with solvents or by centrifugation and their concentrations are determined using immunoassays<sup>22-24</sup>.

Therefore, the aim of this study is (i) to develop a new methodology based on ultrasound, liquid-liquid extraction and LC-MS analysis capable of analysing eight sterols, four bile acids and five hormones simultaneously in an easy and fast way; (ii) to study those faecal biomarkers from different *fumier* samples from Los Husos I and Los Husos II rock shelter so as to try discover the origin of the faecal input; (iii) to verify if sex hormones can give information according to herd distribution.

## 4.2. MATERIALS AND METHODS

### 4.2.1 Chemicals

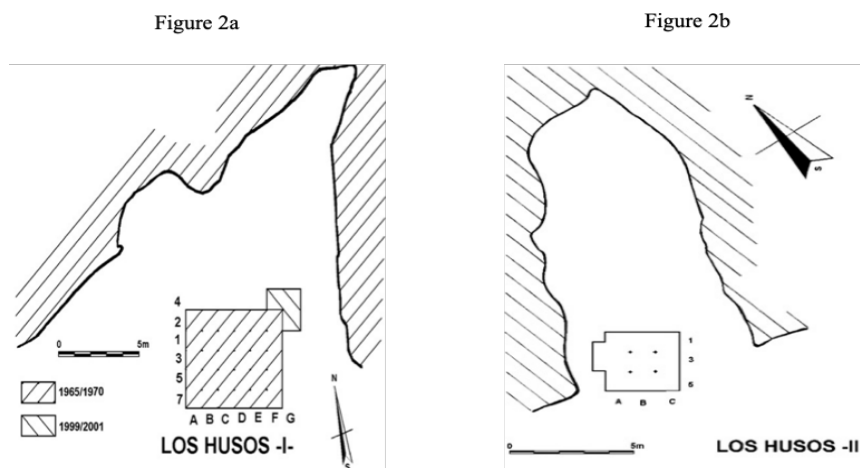
Sex hormone reference standards E2 (99.7%), E1 (99%), TT (99.9%) and PG (99.6%) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany, whereas E3 (99.7%) was obtained from Riedel-de HaenSeelze (Steinheim, Germany). Bile acids standards ursodeoxycholic acid (Urso, 99%), chenodeoxycholic acid (Cheno, 97%), Deox (98%) and Lit (95%) were provided from Sigma-Aldrich. Sterols standard EpiCop (95%), CHOL (99%), Cop (98%), Stigterol (95%), Col (94.8%), Camp (65%), Sit (95%) were purchased from Sigma-Aldrich, epi-5 $\beta$ -Stigmastanol (Stigtanol, 95%) was purchased from Chiron AS, Stikkestadveien 1, NO-7041 Trondheim, Norway, Internal standards estradiol deuterated ([<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-E2, 98%), lithocholic deuterated ([<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Lit, 98%) and cholesterol deuterated ([<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-CHOL, 98%) were obtained from Sigma-Aldrich, while  $\beta$ -sitosterol deuterated [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-Sit, 98%) was supplied from C/D/N Isotopes (Point Claire, Quebec, Canada).

Organic solvents such as methanol (MeOH) dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (EtOAc) were procured from Scharlab (HPLC grade, Barcelona, Spain). KOH and HCl were supplied by Scharlab and Fisher Scientific (Loughborough, UK) respectively.

#### **4.2.2 Sampling and storage**

Los Husos I and Los Husos II rock-shelters are located in the south side of the Sierra de Cantabria (Elvillar, mid-upper Ebro Valley, north-central Spain)<sup>9,28</sup>. Micromorphological analysis have demonstrated the use of both sites to shelter herbivores<sup>9</sup>. Sedimentary layers from Los Husos I (Figure 4.2a) date from the Bronze Age (1020-2210 B.C), while Los Husos II (Figure 4.2b) sediments are older and date from the Neolithic age (3630-5040 B.C)<sup>29</sup>.

38 samples (19 from Los Husos I and 19 from Los Husos II) were collected from successive stabling accumulations using a small gardening shovel, a spatula and a masonry brush. All the material was cleaned with MeOH and Milli-Q water. Soil samples were wrapped in aluminium foil and stored in separately zip-bags at a constant temperature of 4°C. Once in the laboratory, soil samples were sequentially grinded into a fine powder in a pestle and mortar, dried at 90°C for 12h, sieved until 60µm particle size fraction and stored at -80°C until its analysis. Special attention was given to all the cultural layers covering the full chronological span at both sites. In addition the most representative sedimentary facies were sampled to enable correlation of results in terms of composition and formation process



**Figure 4.2** a) *Los Husos I*, plan of the rock-shelter including both early (1965-1970) and recent (1999-2001) excavation areas; b) *Los Husos II*, plan of the rock-shelter and excavation area. Images taken from<sup>9</sup>

### 4.2.3 Ultrasound bath extraction

5 g of the archaeological sample were weighed in falcon tubes. Then, 25 $\mu$ L of the 10 mg L<sup>-1</sup> internal standard solutions were added ([<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-E2, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Lit, [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-CHOL and [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-Sit) and sterols, bile acids and hormones were ultrasonically extracted (Ultrasons, JP.Selecta, Barcelona, Spain) with a mixture of 25mL DCM:MeOH (2:1 v/v) for 30 min. Afterwards, the mixture was centrifuged 5 minutes at 4,200rpm (UNICEN, Ortoalresa, Spain). Finally, the supernatant was collected and dried under a gentle stream of nitrogen.

### 4.2.4 Saponification step

The dried extracts were saponified by adding 5 mL of 2M KOH (MeOH:H<sub>2</sub>O, 10:1 v/v) and incubated at 100°C for 90 min.

### 4.2.5 Liquid-liquid extraction

5 mL 2M HCl/H<sub>2</sub>O were added to the saponified extracts in order to acidify the solution (pH = 2 ≤ x ≤ 4). Afterwards, a continuous liquid-liquid extraction with DCM (2 x 10 mL) was carried out. The lower organic phase was collected in new falcon tubes



and evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The extract was redissolved in 250  $\mu\text{L}$  of MeOH. Finally, after centrifuging for 5 min at 13,000 rpm (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Germany) the supernatant was transferred to chromatography vial inserts.

#### **4.2.6 LC-MS analysis**

Samples were analysed on an Agilent 1290 infinity liquid chromatography system (Palo Alto, SA, USA) consisting of 1290 binary pump, 1290 autosampler and Infinity TCC oven modules. The chromatographic separation was performed on an Ascentis Express C<sub>18</sub> HPLC column (15 cm, 3.0 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ; Supelco, Sigma-Aldrich). The temperature of the column was set at 35°C. The mobile phase consisted of a gradient eluting phase. Solvent A was MilliQ water and solvent B was MeOH. The elution of the analytes was achieved with the following solvent gradient: 0 min 35% A and 65% B; 3 min 26.3% A and 73.7% B; 4 min 25.0% A and 75.0% B; 8 min 15.0% A and 85.0% B; 10 min 1.6% A and 98.4% B; 20 min 0.9% A and 99.1% B; 22 min 0.0% A and 100% B; 23 min 35.0% A and 65.0% B. The flow rate of the mobile phase was set to 0.6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and the volume of injection was 1  $\mu\text{L}$ .

The mass spectrometer (Agilent 6120) was configured for atmospheric pressure chemical ionization (APCI). The scan event was conducted in a positive ion mode. Source conditions were as follows: capillarity voltage, 3000V; drying gas temperature, 300°C; drying gas flow, 3.0  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; and nebulizer gas pressure, 20 psig. Measurements were performed in selected ion monitoring (SIM) mode. Table 4.1 shows retention times and quantifier and qualifier ions of all compounds.

**Table 4.1** LC-MS details for hormones, bile acids and sterols.

	Retention time (min)	Quantifier ion	Qualifier ion
<b>E3</b>	1.46	271.1	253.1
<b>[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-E2</b>	2.906	258.2	249.1
<b>E2</b>	2.92	255.2	271.0
<b>E1</b>	3.025	271.1	253.1
<b>TT</b>	3.331	289.2	271.1
<b>Urso</b>	3.97	357.2	358.2
<b>PG</b>	4.983	315.2	313.1
<b>Cheno</b>	7.69	357.2	339.1
<b>Deox</b>	7.864	357.2	355.0
<b>[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Lit</b>	9.194	364.3	346.3
<b>Lit</b>	9.539	359.3	341.2
<b>EpiCop</b>	14.96	371.3	385.3
<b>[<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-CHOL</b>	15.53	376.4	390.3
<b>CHOL</b>	15.61	369.3	383.3
<b>Cop</b>	15.88	371.3	385.3
<b>Stigterol</b>	16.27	409.3	395.3
<b>Col</b>	16.31	371.3	383.2
<b>Camp</b>	16.36	397.3	383.3
<b>[<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-Sit</b>	16.98	404.4	418.3
<b>Sit</b>	17.09	397.3	411.2
<b>Stigtanol</b>	17.96	399.3	413.4

### 4.3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 4.3.1 Optimization of the sonication time and extraction efficiency

Sonication procedure was optimized using blank soil samples spiked at low and high concentrations for all compounds. In order to determine the low and the high concentration, the limit of detection (LOD) of each compound was approximately calculated from three blank replicates. Three times the average of the signal plus three times the standard deviation was used to determine the LODs ( $S_{\text{blank}} + 3S_{\text{blank}}$ ). When no signal was observed three times the chromatographic noise was used to calculate LOD ( $S=3N$ ). Thus, the sample was spiked at 2xLOD for low concentration and 10xLOD for high concentration. Each concentration level was developed by triplicate.

Afterwards, two different sonication times were studied (15 and 30 min). Following to the extraction, saponification step, liquid-liquid extraction and LC-MS analysis were carried out for each sample. As first approach, an instrumental calibration was used to calculate the apparent recoveries at two extraction times (corrected by deuterated analogues). As it is observed in table 4.2, the apparent recoveries were too low at two concentration levels with 15 min of extraction. Besides, some analytes such as TT, PG, CHOL, Sit and Stiganol were not extracted. Increasing the extraction time, the apparent recoveries improved (table 4.2). However, due to the matrix effect, some analytes recoveries were higher than 200%. Therefore, a procedural calibration (calibration in a blank matrix) was carried out in order to improve the apparent recoveries and reduce the matrix effect.

In that case, the apparent recoveries obtained were acceptable (70-129% at low concentration and 65-110% at high concentration) except for TT and RSD% values were always below 25%. Thereafter, procedural calibrations were used for analyte concentration calculation and TT quantification was discharged.

To sum up, evidence suggests that efficiency and reproducibility of the extraction is optimum when combining 30 min of sonication with the use of procedural calibration curves for estimating final analyte concentration.

### **4.3.2 Methodology quality assurance parameters**

#### *4.3.2.1 Calibration curves correlation coefficient and stability*

Six instrumental calibration standards with crescent concentrations (0.05; 0.1; 0.3; 1; 3 and 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of each compound plus 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of the surrogates were prepared. Instrumental calibration curves were then obtained by plotting the ratio peak area of each compound to the peak area of the surrogates against the compound concentration. Squared correlation coefficient ( $r^2$ ) was higher than 0.99 for all compounds. Additionally, long-term stability of calibration standards was evaluated by comparing calibration curves slopes of freshly standards with those obtained after storing the standards 35 days at  $-38^\circ\text{C}$ . After performing *F-test* and *t-test*, it was determined that E3, TT, Urso, PG,

Cheno, Deox, Lit, Sit and Stigterol calibration curves were statistically different ( $p$ -value $<0.05$ ), meaning that those compounds are not long-term stable. Consequently, calibration curves have to be prepared previous to the analysis.

Six procedural calibration standards were also prepared by spiking blank soil samples so as to have a final increasing concentration (10; 25; 50; 150; 250 and 500  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) of each analyte plus 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  of the internal standards. Three blanks were simultaneously processed in order to subtract the innate analytes response. All procedural calibration curves gave good linearity with  $r^2$  values greater than 0.99. Short-term stability was assessed by storing the standards for 5 days at  $-38^\circ\text{C}$ .  $r^2$  values were lower than 0.98 meaning that all compounds losed linearity due to degradation. As a result, procedural curves have to be prepared previous to the analysis.

**Table 4.2** Percentage of apparent recovery and RSD values after sonicating 15 or 30 minutes three replicates of soils samples spiked at low and high concentration for all compounds. Notice that cholesterol apparent recovery is calculated using its surrogate procedural calibration curve.

	Apparent Recoveries (%)											
	Sonicating 15 min						Sonicating 30 min					
	Instrumental calibration			Instrumental calibration			Instrumental calibration			Procedural calibration		
	Low	High	%RSD	Low	High	%RSD	Low	High	%RSD	Low	High	%RSD
E3	284	37	10	90	1	104	5	70	1	65	5	
E2	53	53	12	83	14	67	12	84	11	70	13	
E1	51	56	8	90	7	53	3	76	12	71	4	
TT	-	10	97	197	1	20	4	325	-	224	29	
Urso	55	73	9	76	1	85	9	111	14	92	14	
PG	-	7	124	205	10	20	1	116	21	110	13	
Cheno	57	79	7	105	7	96	3	109	5	89	10	
Deox	63	45	9	68	12	49	9	84	16	82	9	
Lit	46	64	5	77	11	75	5	113	16	65	11	
EpiCop	31	58	17	110	22	62	12	126	12	85	12	
CHOL	-	-	-	-	-	-	-	129	25	76	20	
Cop	52	36	6	61	4	37	21	114	4	84	21	
Stigterol	35	38	23	133	1	63	9	129	1	76	9	
Col	628	110	15	941	14	240	16	99	18	85	8	
Camp	49	41	16	86	6	61	16	75	7	87	15	
Sit	-	-	-	207	32	105	25	113	10	103	19	
Stigstanol	-	-	-	208	113	48	41	70	5	69	11	

#### 4.3.2.2 Study of the matrix effect

As mentioned above, blank soil is not absolutely blank for some compounds, such as CHOL; as a consequence, both instrumental and procedural matrix effect were measured using deuterated compounds.

Instrumental matrix effect was assessed by comparing analyte predicted concentrations acquired after spiking already processed blank soil with  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  of  $[\text{}^2\text{H}_3]\text{-E2}$ ,  $[\text{}^2\text{H}_5]\text{-Lit}$ ,  $[\text{}^2\text{H}_7]\text{-CHOL}$  and  $[\text{}^2\text{H}_7]\text{-Sit}$  with those obtained from unextracted compounds. Concentrations were obtained extrapolating analytes response in the instrumental calibration curves. While no matrix effect was apparent for  $[\text{}^2\text{H}_3]\text{-E2}$  and  $[\text{}^2\text{H}_5]\text{-Lit}$  (102.2% and 112.28% respectively),  $[\text{}^2\text{H}_7]\text{-CHOL}$  and  $[\text{}^2\text{H}_7]\text{-Sit}$  ionizations were negatively suppressed (25.9% and 27.0% respectively).

On the other hand, procedural matrix effect was quantified by comparing analyte predicted concentrations acquired after processing blank soil spiked with  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  of  $[\text{}^2\text{H}_3]\text{-E2}$ ,  $[\text{}^2\text{H}_5]\text{-Lit}$ ,  $[\text{}^2\text{H}_7]\text{-CHOL}$  and  $[\text{}^2\text{H}_7]\text{-Sit}$  with those obtained from processing 25mL of the extract solvent spiked with the analytes. In that case, concentrations were extrapolated using the procedural calibration curves. Even though  $[\text{}^2\text{H}_3]\text{-E2}$  and  $[\text{}^2\text{H}_5]\text{-Lit}$  ionizations were slightly enhanced (121.4% and 126.9%) and  $[\text{}^2\text{H}_7]\text{-CHOL}$  and  $[\text{}^2\text{H}_7]\text{-Sit}$  ionizations were lightly suppressed (62.0% and 60.7%), results were still acceptable. Besides, it corroborates the necessity of using the procedural calibration curves plus correction with surrogates to minimize the influence of the matrix effect.

#### 4.3.2.3 Calculation of detection and quantification limits

Detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ) were calculated using the signals obtained after processing 25mL of the extract solvent just spiked with the deuterated compounds. Two different criteria were used to calculate these limits:

- No peaks in the blank:  $S_{\text{LOD}}$  and  $S_{\text{LOQ}}$  were calculated with the signal-to noise ratio (S/N) 3:1 and 10:1 respectively.

- Peaks in the blank: In this case, limits were calculated using the signal and its standard deviation as it is shown in eq. 3.6 and 3.7.

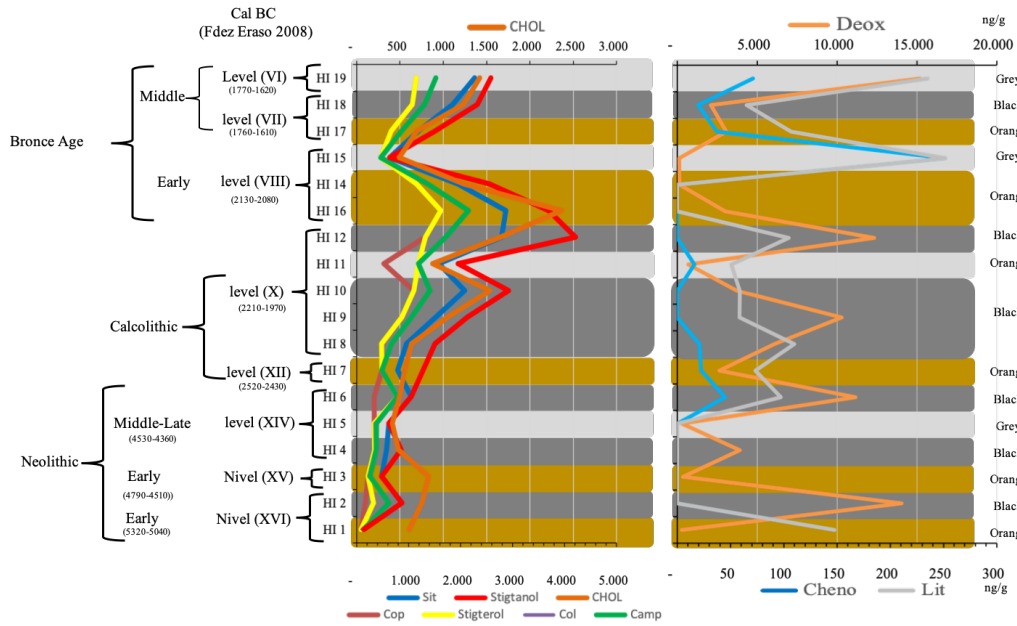
$$S_{LOD} = \bar{S} + 3s \text{ and } S_{LOQ} = \bar{S} + 10s \quad (\text{Eq. 3.6 and 3.7})$$

So in all, for the hormones, bile acids and EpiCop, Stigterol and Camp,  $C_{LOD}$  and  $C_{LOQ}$  values ranged between 11 to 37 ng g<sup>-1</sup> and 38 to 126 ng g<sup>-1</sup> respectively. On the other hand,  $C_{LOD}$  and  $C_{LOQ}$  for Col, Cop, Sit and Stigtanol, stayed between the intervals 102 to 162 ng g<sup>-1</sup> and 131 to 294 ng g<sup>-1</sup> respectively.

### **4.3.3 Analysis of the archaeological samples**

#### *4.3.3.1 Source identification*

38 samples from several *fumiers* and different *facies* located at Los Husos I and Los Husos II were analysed. Sterol and bile acid profile of each sample is summarized at Table 4.3 and Figures 4.3 and 4.4. In general, all the sterols studied were detected in all the samples except for EpiCop and Urso (Table 4.3). The absence of EpiCop could be attributed to the *fumiers* composition, where there is a conversion of EpiCop to its epimer Cop. On the other hand, Stigtanol is detected in all samples but in low concentration. In the case of Los Husos I (Figure 4.3), the higher concentration of sterols has been found in the no burned orange *facies* (HI 14 and HI16), middle concentration in the black *facies* (HI12 and HI 10) and low concentration in grey *facies* (HI 15 and HI 11), however, in the last grey layer (HI19) the highest levels of Stigtanol was found. In the case of the bile acids, the higher concentration of Deox was found in the black *facies* (HI 2, HI 6, HI 9, HI 12 and HI 12) and in the grey (dung ash) *facies* (HI19). Besides, the distribution and the pattern along the *facies* is very different in both, sterols/phytosterols and biles acid. That could be attributed to poor conservation of the site and the possible oxidation of the *facies* and the analytes.

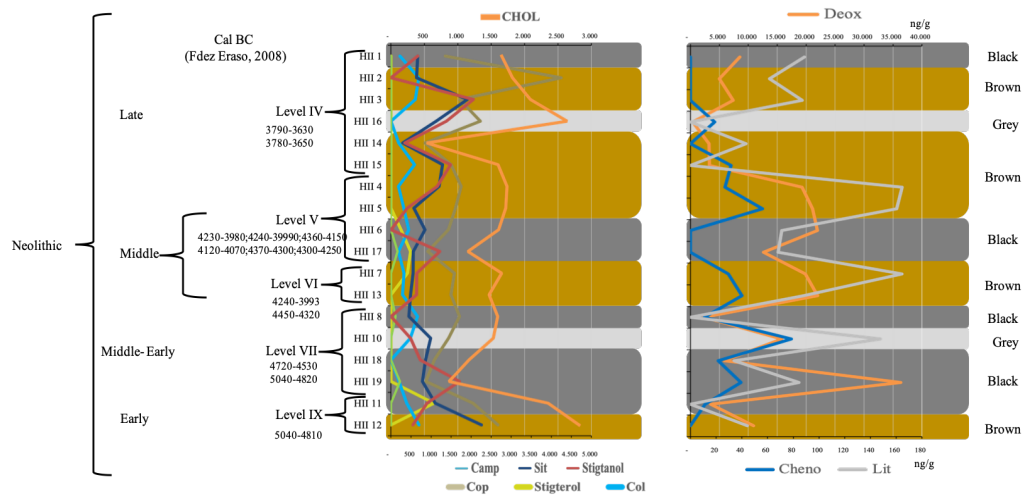


**Figure 4.3.** Illustration of the faecal biomarkers concentration (ng/g) obtained in each fumier samples from Los Husos I.

On the other hand, in the case of Los Husos II, the higher concentration of sterols has been found in the brown *facies* (HII 2, HII 16, HII 4 and HII 12) and low concentration in black *facies* (HII 6, HII 17, HII 1 and HII19). That results were expected due to the thermal exposition of black ones. On the other hand, the grey *facies* (HII 10) has been studied, gave similar concentration to HII 8 and HII 18 black layers, both of them located above and below that grey *facies*. In the case of the bile acids the greater concentration of Deox and Lit was found in the layers (HII 19, HII 13, HII 6, HII 7, HII 4, HII 17, HII 10), and as noted before, the presence of high concentration of Deox can be very valid evidence of more activity in the pens along those periods of time. Thus, Level IV shows lower activity than the others and Level V and VI shows the highest activity. Level VII and IX do not show a clear tendency and low and high activities are observed. In Level VII, HII19, shows the highest activity of all the *facies* analyzed. Curiously, HII10 again (grey *facies*) shows higher concentration of bile acids than its previous and later *facies* (black *facies*). That could be explained due to the lixiviation of



the target analytes from the black *facies* above (HII8) which is the *facies* with lowest bile acids concentration.



**Figure 4.4.** Illustration of the faecal biomarkers concentration (ng/g) obtained in each fumier sample from Los Husos II.

In order to determine the provenance of the sediments, Eq. 3.1 and Eq. 3.2 were used. The main objective of using those equations was to evaluate the differences and coincidences obtained using each equation. When we were trying to characterize the residues into ruminant or omnivore, based on its sterol ratio (Eq. 3.1 or Eq. 3.2) and bile acid ratio (Eq. 3.3), did not always lead to the same conclusion. For instance, according to Eq. 3.3 all the samples gave positive in ruminant residues (Table 4.3), for that, the concentration of Deox has to be, at list, 10 times higher than Lit concentration; whilst the result of Eq. 3.1 gave positive in ruminant in only 8 samples (HI 12, HI 8, HII 3, HII14, HII15, HII17 and HII 19), in the rest of samples give positive in omnivore or no classifiable samples and Eq. 3.2 gave always positive in omnivore, except for HII19.

**Table 4.3** Age Cal BC, sample, level, concentration (ng/g), classification with different equations and colour of the sample.

Cal BC	Sample	Level	Cop	EpiCop	Stigstanol	Lit	Deox	Cheno	Urso	Eq.3.1	Eq. 3.2.	Eq.3.3	Layer
1770-1620	HI 19	VI	685	<LOD	184	164	6930	9173	<LOD	Omnivore (3.7)	Omnivore (79)	Ruminant (42)	Grey
	HI 18	VII	642	<LOD	283	46	1041	1193	<LOD	Omnivore (2.2)	Omnivore (69)	Ruminant (23)	Black
	HI 17	VII	398	<LOD	190	69	1867	1387	<LOD	Omnivore (2.1)	Omnivore (68)	Ruminant (27)	Orange
2130-2080	HI 15	VIII	278	<LOD	<LOD	<LOD	124	252	<LOD	No classifiable	No classifiable	Ruminant (no Lit)	Grey
	HI 16	VIII	970	<LOD	496	<LOD	2991	<LOD	<LOD	Omnivore (2.0)	Omnivore (66)	Ruminant (no Lit)	Brownish
	HI 14	VIII	693	<LOD	365	<LOD	134	<LOD	<LOD	Omnivore (1.9)	Omnivore (66)	Ruminant (no Lit)	Orange
	HI 12	X	792	<LOD	855	105	5272	8186	<LOD	Ruminant (0.9)	?? (48)	Ruminant (50)	Black
2210-1970	HI 11	X	314	<LOD	221	35	429	309	<LOD	Omnivore (1.4)	?? (59)	Ruminant (12)	Grey
	HI 10	X	660	<LOD	506	59	3720	<LOD	<LOD	Omnivore (1.3)	?? (57)	Ruminant (63)	Black
	HI 9	X	524	<LOD	366	59	4862	6246	<LOD	Omnivore (1.4)	?? (59)	Ruminant (83)	Black
	HI 8	X	286	<LOD	330	89	4096	2289	<LOD	Ruminant (0.9)	?? (46)	Ruminant (46)	Black
	HI 7	XII	293	<LOD	296	51	1634	1112	<LOD	Ruminant (1.0)	?? (50)	Ruminant (32)	Orange
2520-2430	HI 6	XIV	204	<LOD	<LOD	52	7749	3528	<LOD	No classifiable	No classifiable	Ruminant (148)	Black
	HI 5	XIV	203	38	<LOD	<LOD	292	<LOD	<LOD	No classifiable	No classifiable	Ruminant (no Lit)	Grey
	HI 4	XIV	206	<LOD	173	<LOD	1903	2226	<LOD	Omnivore (1.2)	?? (54)	Ruminant (no Lit)	Black
	HI 3	XV	133	<LOD	<LOD	<LOD	198	194	<LOD	No classifiable	No classifiable	Ruminant (no Lit)	Orange
5320-5040 3790-3630	HI 2	XVI	102	<LOD	<LOD	<LOD	6525	8583	<LOD	No classifiable	No classifiable	Ruminant (no Lit)	Black
	HI 1	XVI	53	<LOD	<LOD	<LOD	290	148	<LOD	No classifiable	No classifiable	Ruminant (no Lit)	Orange

Table 4.3(Continuation)

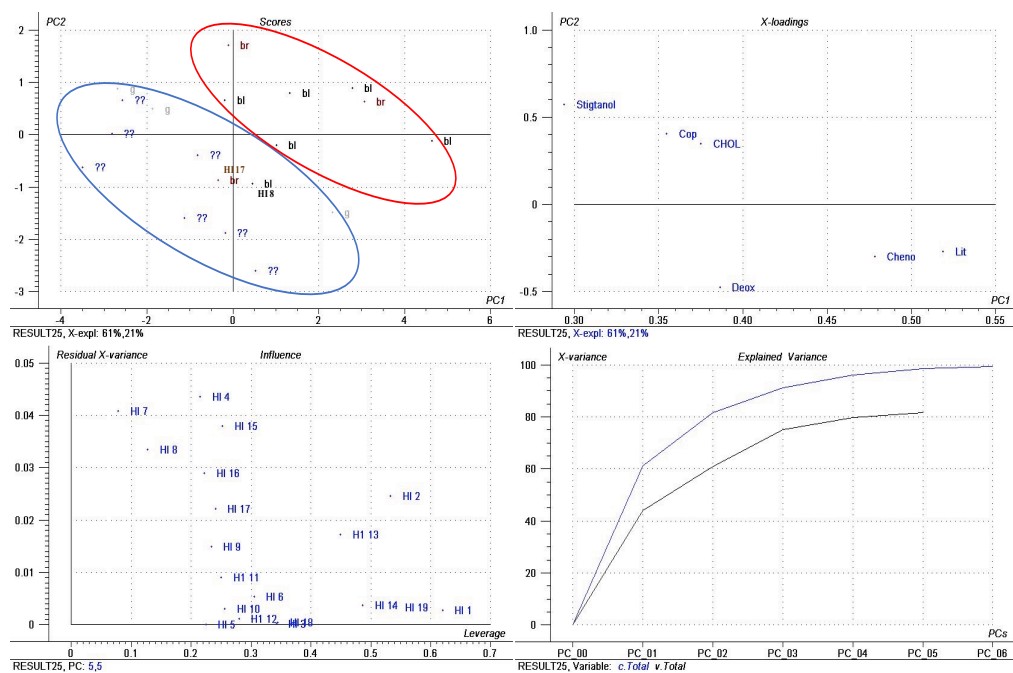
Cal BC	Sample	Level	Cop	EpiCop	Stigtanol	Lit	Deox	Cheno	Urso	Eq.3.1	Eq. 3.2.	Eq.3.3	Layer
3780-3650	HII 1	IV	632	<LOD	401	89	8521	<LOD	<LOD	Omnivore (1.6)	?? (61)	Ruminant (96)	Black-Brownish
	HII 2	IV	2366	<LOD	<LOD	61	4994	<LOD	<LOD	No classifiable	No classifiable	Ruminant (81)	Brownish
	HII 3	IV	847	<LOD	1235	87	7389	<LOD	<LOD	Ruminant (0.7)	?? (41)	Ruminant (85)	Black-Brownish
	HII 16	IV	1005	<LOD	830	<LOD	394	19	<LOD	Omnivore (1.2)	?? (55)	Ruminant (no Lit)	Brownish
	HII 14	IV	329	<LOD	209	43	3216	<LOD	<LOD	Omnivore (1.6)	?? (61)	Ruminant (74)	Brownish
4230-3980 4240-3990 4360-4150 4120-4070 4370-4300 4300-4250	HII 15	IV	721	<LOD	893	<LOD	3295	32	<LOD	Ruminant (0.8)	?? (45)	Ruminant (no Lit)	Light Brownish
	HII 4	V	872	<LOD	694	165	19290	27	<LOD	Omnivore (1.3)	?? (56)	Ruminant (117)	Brownish
	HII 5	V	786	<LOD	244	160	21116	56	<LOD	Omnivore (3.2)	Omnivore (76)	Ruminant (132)	Brownish
	HII 6	V	678	<LOD	<LOD	71	21963	<LOD	<LOD	No classifiable	No classifiable	Ruminant (309)	Black
	HII 17	V	369	<LOD	731	68	12633	<LOD	<LOD	Ruminant (0.5)	?? (34)	Ruminant (185)	Black
	HII 7	VI	767	<LOD	386	164	19869	29	<LOD	Omnivore (2.0)	Omnivore (67)	Ruminant (121)	Brownish
	HII 13	VI	718	<LOD	383	88	21975	40	<LOD	Omnivore (1.9)	Omnivore (65)	Ruminant (250)	Brownish
4720-4530 5040-4820	HII 8	VII	846	<LOD	<LOD	0	2303	11	<LOD	No classifiable	No classifiable	Ruminant (no Lit)	Black
	HII 10	VII	683	<LOD	293	148	15751	79	<LOD	Omnivore (2.3)	Omnivore (70)	Ruminant (107)	Grey
	HII 18	VII	470	<LOD	437	34	5856	22	<LOD	Omnivore (1.1)	?? (52)	Ruminant (172)	Black
	HII 19	VII	343	<LOD	1026	84	36351	39	<LOD	Ruminant (0.3)	Ruminant (25)	Ruminant (430)	Black
	HII 11	IX	1048	<LOD	539	<LOD	3489	11	<LOD	Omnivore (1.9)	Omnivore (66)	Ruminant (no Lit)	Black
5040-4810	HII 12	IX	1422	<LOD	329	44	10913	<LOD	Omnivore (4.3)	Omnivore (81)	Ruminant (247)	Brownish	

Consequently, this mismatch between both ratios led to the possibility that maybe one of them was failing to identify the faecal source in *fumier* structures. Therefore, in order to clarify which ratio might be wrong, we checked results with archaeologists hope to find and in view of remains (bones and other evidences) found in the *fumiers*, Eq. 3.3 ratio was chosen to characterize the samples. And finally, in order to determine why the results of the Eq. 3.1 ratio were wrong, the lower concentration of Stigتانول found in the samples as the main reason (Table 4.3).

In order to compare all ruminant and not classifiable residues, the logarithmic concentration of 6 analytes (Stigتانول, Cop, CHOL, Deox, Cheno and Lit) were used to make a principal component analysis (PCA) of each rock-shelter separately. For this purpose, we used the commercially available software *The Unscramble 9.7*.

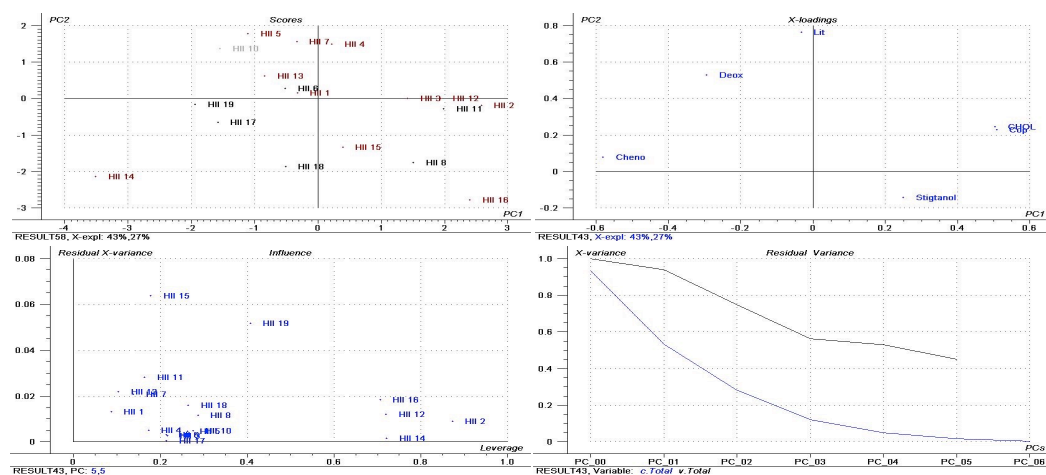
In the case of Los Husos I with a confidence level of 82% this model was not able to classify biogenic origin. However, brown and black samples with the rest of samples separation was possible (Figure 4.5) except in the case of HI 17 and HI 8. Maybe, the lower concentration of biomarkers in those samples by degradation could be an important reason in the no classification with other ones. Thus, the behaviour of black and brown *facies* are similar compared to the rest.

Combined quantification of biomarkers in fumier samples from Los Husos I and Los Husos II



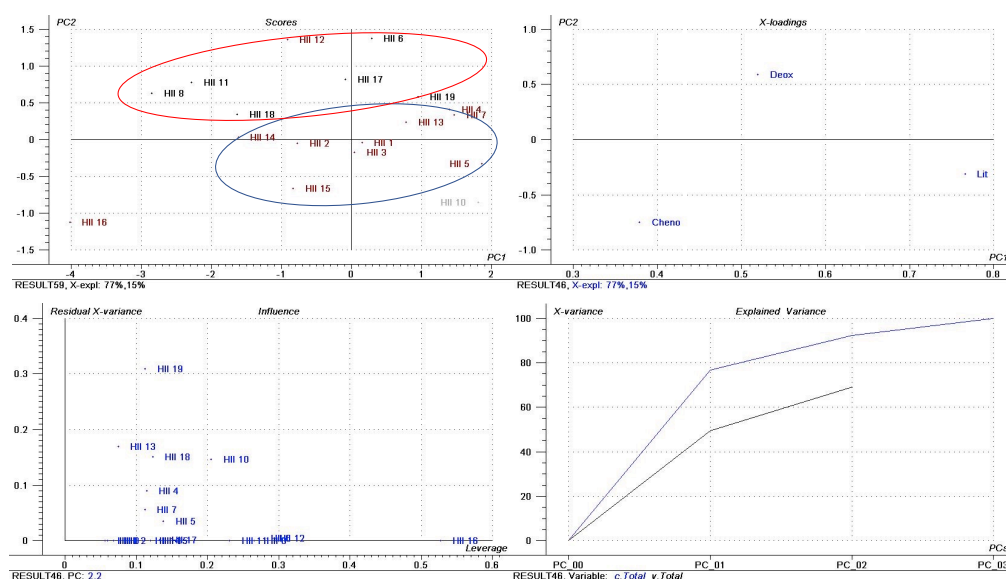
**Figure 4.5** Principal component analysis for Los Husos I residues samples according to the logarithmic concentration values of Cop, EpiCop, Stiglanol, Lit, and deox. PC2 (21%) versus PC1 (61 %) is illustrated.

On the other hand, in the case of Los Husos II, PCA was no able to show any group and residual variance was very poor (Figure 4.6).



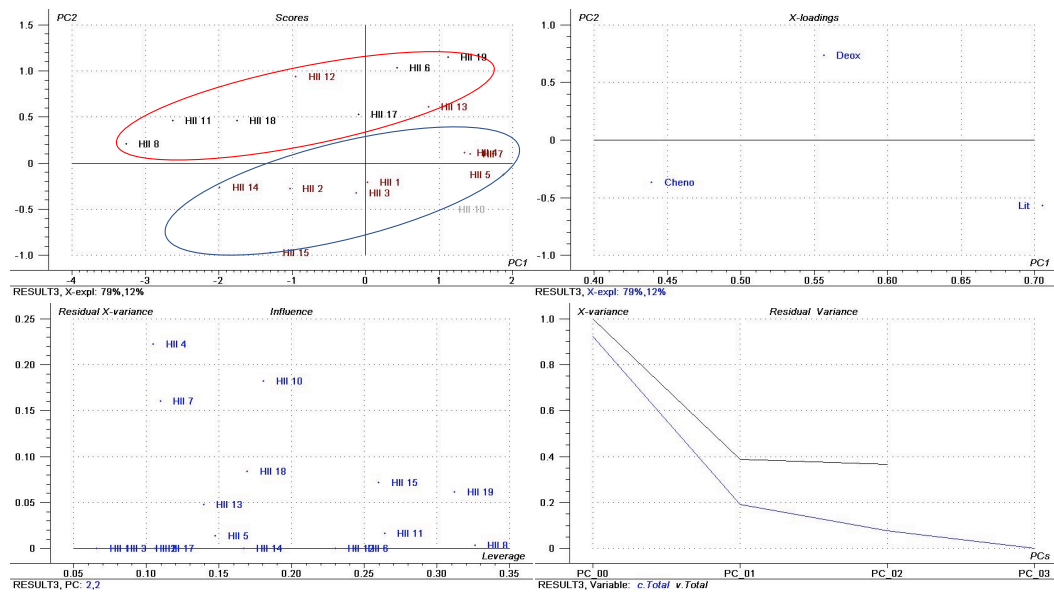
**Figure 4.6** Principal component analysis for Los Husos II residues samples according to the logarithmic concentration values of Cop, EpiCop, Stiglanol, Lit, Cheno and Deox. PC2 (27%) versus PC1 (43 %) is illustrated.

In order to improve that variance, bile acids variables (Cheno, Deox and Lit) was just considered to make de PCA. That way, black and brown *facies* were separated each other (Figure 4.7), except HII 12 brown layer (the oldest *facies*) which was grouped with black *facies* and HII16 which corresponds to the *facies* with the lowest bile acids' concentration. This model describes the 92% of the variation (PC1, 77% vs PC2, 15%).



**Figure 4.7** Principal component analysis for Los Husos II residues samples according to the logarithmic concentration values of Lit, Cheno and Deox. PC2 (27%) versus PC1 (43 %) is illustrated.

Due to the high leverage of sample HII 16 (lowest bile acid concentration sample) and the possible high influence in the grouping, we decided to remove it from the model. As it is observed in Figure 4.8, that model describes the 91% of the variation PC 1(79%) versus PC 2 (12%) and a better black and brown separation had been obtained, but similar to previous model (Figure 4.7), HII 12 and HII 13 brown layers behaviour is similar to black ones (Figure 4.8).



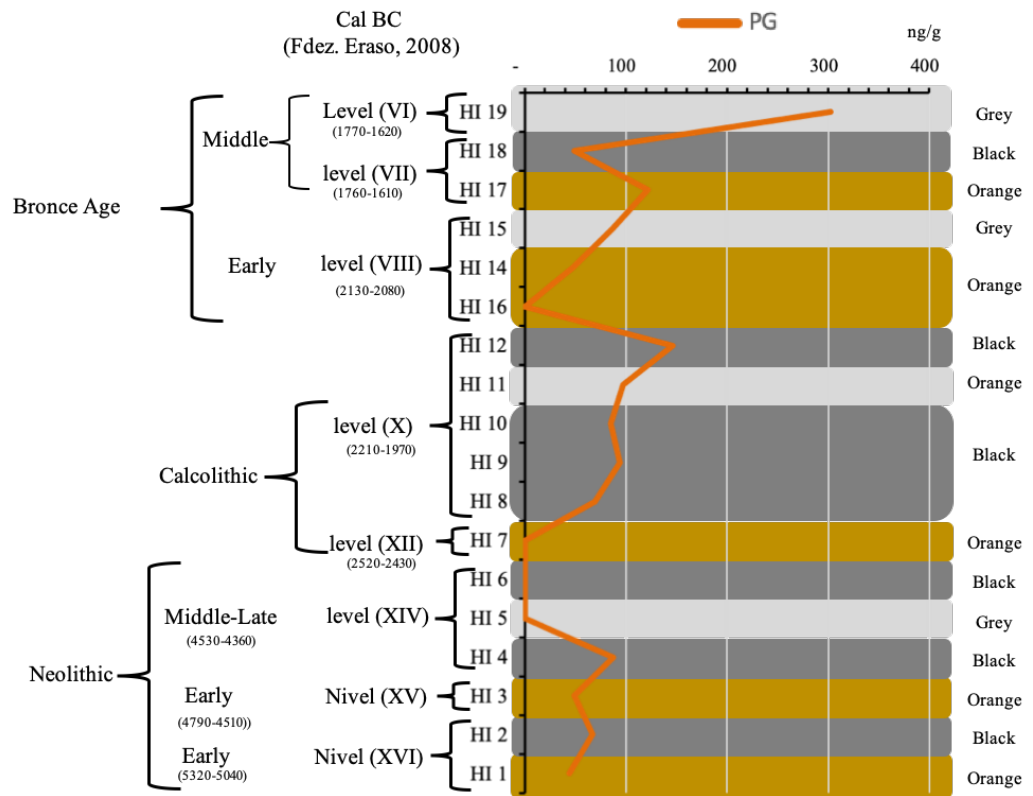
**Figure 4.8** Principal component analysis for Los Husos II residues samples according to the logarithmic concentration values of Lit, Cheno and Deox. Ruling the brown sample HII 16, PC2 (12 %) versus PC1 (79 %) is illustrated.

### 4.3.3.2 Hormone analysis

In order to determine possible shepherds' practices such as the separation of females in gestation period and new-borns from the rest of the herd, sex hormones were analysed. As it is shown in Figure 4.9 and Figure 4.10, just PG is present in the samples, revealing a higher resistance towards degradation in soil.

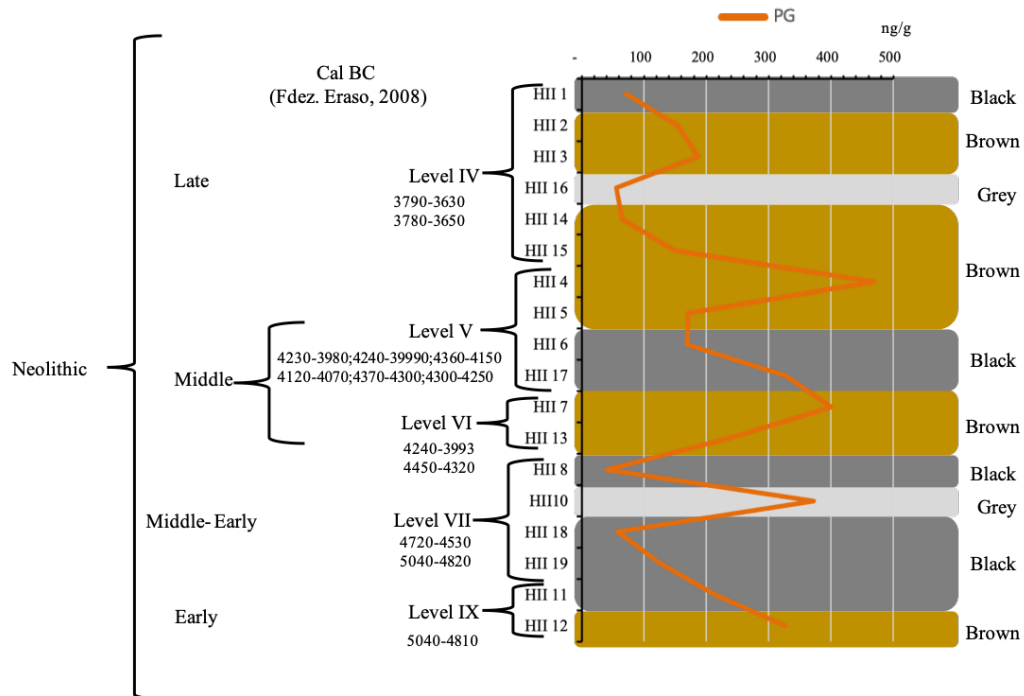
In the case of Los Husos I, the higher concentration of PG was found in the HI 19, HI12, HI 17, HI11 and HI 9 *facies* and HI 19, a grey *facies* (*dung ash*) shows the highest concentration (Figure 4.9)





**Figure 4.9.** Illustration of the progesterone (PG) concentration (ng/g) obtained in each fumier samples from Los Husos I.

On the other hand, in Los Husos II, the highest concentration of PG was found in the layers (HII 6, HII 4, HII 17 and HII 12), all of them brown and black layers (figure 4.10).



**Figure 4.10.** Illustration of the progesterone (PG) concentration (ng/g) obtained in each fumier samples from Los Los Husos II.

However, those high concentrations could be related with pregnant females and, recently given birth and lambs or with the high amount of sheep in the herd, so a normalization of those values is necessary. Therefore, PG concentration were normalized with Deox concentration (Figure 4.11 and Figure 4.12). In these figures, grey facies have been eliminated due to their low bile acids concentration, which disrupted the results. Those figures show that in facies HII15 and HII16 was a higher excretion of hormones than usual and that could be related with shepherds' practices such as the separation of females in gestation period and new-borns from the rest of the herd.

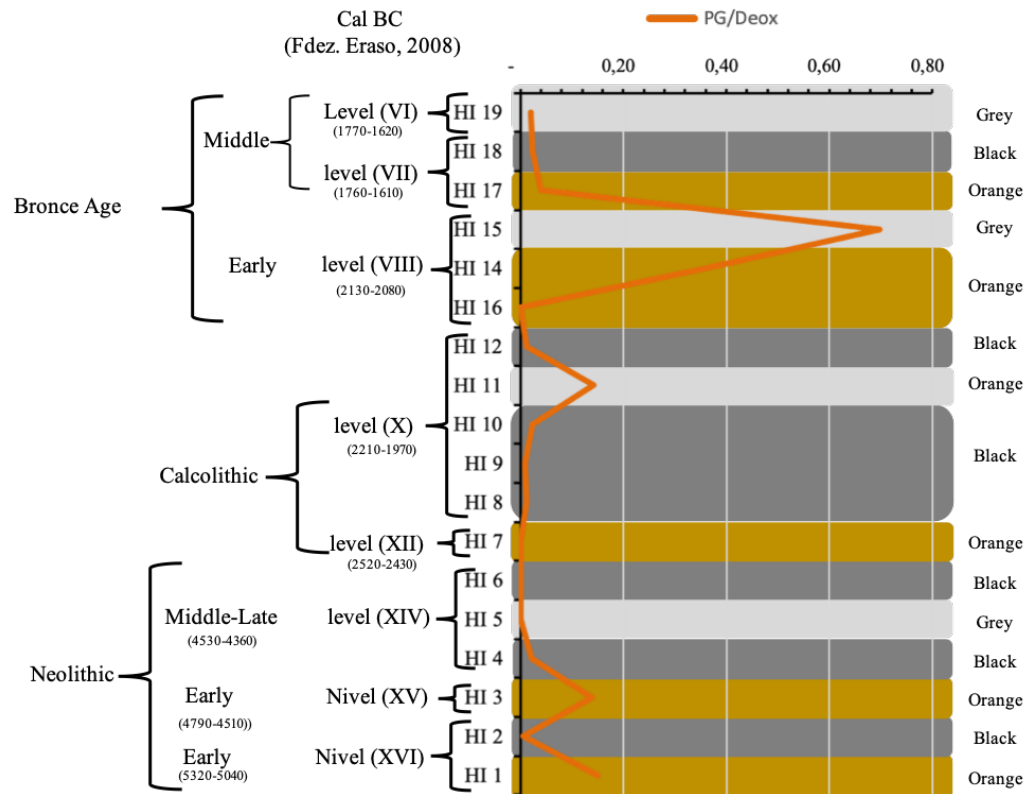
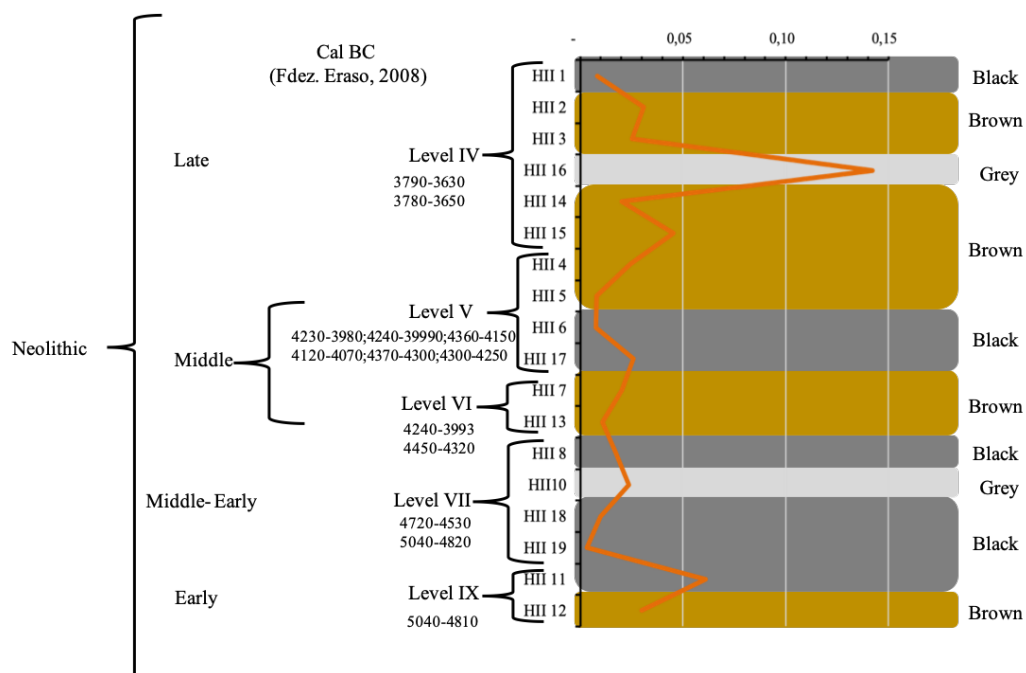


Figure 4.11 Illustration of the progesterone/deoxycholic acid ratio (PG/Deox) obtained in each fumier samples from Los Husos I.



**Figure 4.12** Illustration of the progesterone/deoxycholic acid ratio (PG/Deox) obtained in each fumier samples from Los Husos II.

#### 4.4. CONCLUSIONS

To conclude, a simultaneous determination of four sex hormones (E3, E2, E1 and PG), four bile acids (Urso, Cheno, Deox and Lit) and seven sterols (EpiCop, Cop, Col, Stigterol, Camp, Sit and Stigtanol) has been successfully achieved by combining sonication and liquid-liquid extraction with LC-MS analysis. Additionally, this procedure has been able to identify practically samples from Los Husos I and II as ruminant faeces.

Furthermore, this study has pointed out that Eq. 3.1 is not appropriate in this study because the low concentration of Stigtanol present in the samples.

Finally, PG concentration was present in many of the *facies* studied and the pastoral activity indicator PG/Deox ratio has been proposed.

#### **4.5. BIBLIOGRAPHY**

1. Zeder, M. A. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin : Origins , diffusion , and impact. *PNAS* **105**, 11597–11604 (2013).
2. Larson, G. *et al.* Ancient DNA , pig domestication , and the spread. *PNAS* **104**, 15276–15281 (2007).
3. Gerbault, P. *et al.* Storytelling and story testing in domestication. *PNAS* **111**, 6159–6164 (2014).
4. Ethier, J. *et al.* Earliest expansion of animal husbandry beyond the Mediterranean zone in the sixth millennium BC. *Scientific Reports* **7**, 1–10 (2017).
5. Vergès, J. M., Allué, E. & Fontanals, M. Shepherds and Caves. *Quaternary International* **414**, 199–201 (2016).
6. Angelucci, D. E. *et al.* Shepherds and karst: the use of caves and rock-shelters in the Mediterranean region during the Neolithic. *World Archaeology* **41**, 191–214 (2009).
7. Evershed, R. P. Organic residue analysis in archaeology: The archaeological biomarker revolution. *Archaeometry* **50**, 895–924 (2008).
8. Evershed, R. P. *et al.* Lipids as carriers of anthropogenic signals from prehistory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **354**, 19–31 (1999).
9. Polo-Diaz, A., & Fernandez Eraso, J. Same anthropogenic activity, different taphonomic processes: A comparison of deposits from Los Husos I & II (Upper Ebro Basin, Spain). *Quaternary International* **214**, 82–97 (2010).
10. Rules, R. T. The Nomenclature of Steroids. **10**, 1–19 (1969).
11. Hofmann, A. F. *et al.* A proposed nomenclature for bile acids. *Journal of lipid research* **33**, 599–604 (1992).
12. Tyagi, P., Edwards, D. R. & Coyne, M. S. Fecal sterol and bile acid biomarkers: Runoff concentrations in animal waste-amended pastures. *Water, Air, and Soil Pollution* **198**, 45–54 (2009).

13. Matysik, S., Le Roy, C. I., Liebisch, G. & Claus, S. P. Metabolomics of fecal samples: A practical consideration. *Trends in Food Science and Technology* **57**, 244–255 (2016).
14. Derrien, M., Yang, L. & Hur, J. Lipid biomarkers and spectroscopic indices for identifying organic matter sources in aquatic environments: A review. *Water Research* **112**, 58–71 (2017).
15. Evershed, R. P., Bethell, P. H., Reynolds, P. J. & Walsh, N. J. 5b-Stigmastanol and Related 5b-Stanols as Biomarkers of Manuring: Analysis of Modern Experimental Material and. *Journal of Archaeological Science* 485–495 (1997). doi:10.1006/jasc.1996.0132
16. Gea, J. *et al.* Characterization of ancient lipids in prehistoric organic residues: Chemical evidence of livestock-pens in rock-shelters since early neolithic to bronze age. *Journal of Separation Science* **40**, 4549–4562 (2017).
17. Prost, K., Birk, J. J., Lehndorff, E., Gerlach, R. & Amelung, W. Steroid biomarkers revisited - Improved source identification of faecal remains in archaeological soil material. *PLoS ONE* **12**, 1–30 (2017).
18. Nasini, U. B. *et al.* Determination of bile acid profiles in scat samples of wild animals by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytical Methods* **5**, 6319 (2013).
19. Bull, I. D., Lockheart, M. J., Elhmmali, M. M., Roberts, D. J. & Evershed, R. P. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environment International* **27**, 647–654 (2002).
20. Ruiz-cortés, Z. T. Gonadal Sex Steroids : Production , Action and Interactions in Mammals. *Steroids - From Physiology to Clinical Medicine* 3–44 (2012). doi:10.5772/52994
21. Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme, R. & Bamberg, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* **42**, 515–526 (1996).
22. Kumar, A. *et al.* Faecal steroid metabolites assay as a non-invasive monitoring of reproductive status in animals. *Veterinary World* **6**, 59–63 (2013).
23. Capezzuto, A., Chelini, M. O. M., Felipe, E. C. G. & Oliveira, C. A. Correlation between serum and fecal concentrations of reproductive steroids throughout gestation in goats. *Animal Reproduction Science* **103**, 78–86 (2008).

24. Isobe, N. *et al.* Fecal progesterone and estrone during pregnancy in a giraffe: a case report. *The Journal of reproduction and development* **53**, 159–64 (2007).
25. Shargal, D. *et al.* Fecal testosterone is elevated in high ranking female ibexes (*Capra nubiana*) and associated with increased aggression and a preponderance of male offspring. *Theriogenology* **69**, 673–680 (2008).
26. Birk, J. J., Dippold, M., Wiesenberg, G. L. B. & Glaser, B. Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1242**, 1–10 (2012).
27. Sistiaga, A., Berna, F., Laursen, R. & Goldberg, P. Steroidal biomarker analysis of a 14,000 years old putative human coprolite from Paisley Cave, Oregon. *Journal of Archaeological Science* **41**, 813–817 (2014).
28. Fernández-Crespo, T. & Schulting, R. J. Living different lives: Early social differentiation identified through linking mortuary and isotopic variability in Late Neolithic/ Early Chalcolithic north-central Spain. *PLoS ONE* **12**, 1–19 (2017).
29. Fernández-Eraso, J. & Polo Díaz, A. Establos en abrigos bajo roca de la Prehistoria Reciente: su formación, caracterización y proceso de estudio. Los casos de Los Husos y de San Cristóbal. *Krei* **10**, 39–51 (2008).







Capitulo 5. Caracterización de residuos orgánicos de  
la cueva de El Mirador

---



## 5.1 INTRODUCCIÓN

La cueva de El Mirador como enclave destacable ha sido objeto de multitud de estudios arqueológicos. En la década de los 70 se realizó la primera excavación de donde se pudieron recuperar diferentes objetos pertenecientes al Calcolítico y la Edad del Bronce<sup>1</sup>. Posteriormente, en 1999, se retomaron los trabajos de excavación y se realizó un Sondeo Central de 6 m<sup>2</sup> de diámetro y 20 m de profundidad de los que se extrajeron 5 m de nivel Holoceno y 15 m de depósito Pleistoceno que estaba formado por grandes bloques procedentes del desplome de la bóveda de la cueva (Figura 5.1)<sup>2-4</sup>. El nivel Holoceno del Sondeo Central se puede dividir en un total de 26 subniveles que datan desde el Bronce Medio hasta el Neolítico. Por otro lado, con el objeto de poder avanzar con seguridad hacia el interior de la cueva se han realizado excavaciones en dos sectores adosados a las paredes, el sector 100 situado en la parte NO y el sector 200 situado en la parte NE (Figura 5.1).



Figura 5.1 Cueva del Mirador<sup>5</sup>, descripción detallada de las diferentes facies del sector central.

Tras un análisis de los diferentes niveles estratigráficos del Sondeo Central, se sabe que ese conjunto sedimentológico, no es más que el cúmulo de excrementos de origen animal quemados y parcialmente quemados, que junto con la materia vegetal se han ido acumulando en la cueva debido a la actividad pastoril originada por la estabulación de ganado<sup>3-5</sup>. Este conjunto estratigráfico presenta una variabilidad lateral y vertical en su forma debida fundamentalmente a tres factores<sup>3</sup>:

- La quema periódica de estiércol, que genera una consecución de capas con o sin alteración térmica.
- La intervención del ser humano en la organización del espacio, que genera una acumulación del estiércol en montones, en un momento previo a la quema para facilitar la misma.
- Los procesos postdeposicionales, entre los que destacan las bioturbaciones y pisoteo, que son provocados tanto por seres humanos como por animales.

Con el objeto de poder documentar la variabilidad del conjunto estratigráfico se ha empleado el concepto sedimentario de *facies* o capas, que corresponde al conjunto de características litológicas consideradas desde un punto de vista de su formación (Tabla 5.1). Este conjunto de características litológicas se repiten recurrentemente y llevan un orden: la capa de cenizas (*facies* b, g) y de acumulación de carbones (*facies* n) se superponen a sedimentos alterados térmicamente (*facies* q) o sedimentos orgánicos (*facies* o). En otras zonas del yacimiento, facies arcillosas (*facies* t o v/vl) se alternan con acumulación de excrementos sin combustionar o con combustión parcial (*facies* d)<sup>5</sup>.

En la secuencia Neolítica es importante destacar la buena conservación de los depósitos y sus niveles, ya que se ha podido comprobar mediante estudios paleomagnéticos la uniformidad en la orientación de las cenizas<sup>6,7</sup> en su estado original de formación. Por el contrario, en los niveles superiores de la Edad del Bronce la bioturbación provocada por madrigueras de conejos y zorros son abundantes y ha afectado a la integridad de la secuencia.

**Tabla 5.1:** Descripción de las facies identificadas en la cueva de El Mirador e interpretación de su posible origen<sup>4,8,9</sup>. Aparecen clasificadas según si presentan alteración térmica (a.t), si no la presentan (n.a.t.), si son carbonosas (carb.), cenicientas o están bioturbadas (bt.)<sup>2,4,8</sup>.

n.a.t	a	Facies compuesta por limos arcillosos. Presenta materiales presentes en otras facies, como los esferulitos, cenizas o fitolitos, pero en menor cantidad y mezcladas con el material arcilloso. Destaca también la abundancia de oxalatos de calcio en comparación con los fitolitos. Se trata d una facies derivada de la removilización de sedimentos a causa de la actividad en la cueva.
	v/vl	Facies compuesta por material de origen biogénico (esferulitos y fitolitos) y material geogénico (detritos limoso-arenosos). Su origen estaría en la reelaboración a corta distancia del estiércol del ganado por la superficie del yacimiento durante la estabulación, Su compactación probablemente, se debería al trampling.
cenicientas	b	Acumulaciones de cenizas casi puras con fragmentos de carbones. Abundancia de coprolitos, esferulitos y fitolitos y, en ocasiones, también material detrítico. Esta mezcla puede deberse al piso o a otras causas posdeposicionales. El origen de la facies b sería la combustión de material vegetal.
	f	Facies muy fina de 1 mm compuesta por cenizas blanquecinas y con fibras vegetales todavía visibles a nivel macroscópico, Podría tratarse del fruto de la combustión in situ de un material como la paja, muy probablemente, de trigo.
	g/bg	Acumulaciones de cenizas casi puras con fragmentos de carbones. Muy similar a las facies b y f pero con un mayor contenido de esferulitos y fitolitos.
	i	Limos verdosos con abundantes cenizas, probablemente reelaborados.
	m	Acumulaciones de cenizas de color marrón claro mezcladas con fragmentos de carbones milimétricos.
	s	Sedimento ceniciento fuertemente deformado.
	tf	Limos con abundantes cenizas de color variado.
Carb.	n	Acumulaciones de fragmentos de carbones milimétricos y centimétricos.
	d	Sedimento orgánico de color gris oscuro, compuesto por excrementos de animales descompuestos.
a.t	o	Acumulación de materia orgánica, de color gris oscuro a negro, en la que los excrementos pueden diferenciarse a nivel macroscópico.
	q	Limo arcilloso de color marrón.
b.t	p	Partes de fumier bioturbado.

Para los análisis de la presente Tesis se han empleado muestras del sector 100 y 200, que son sectores en los que se sigue trabajando a día de hoy. Se trata de los sectores adosados en las paredes de la cueva y presentan las mismas características sedimentológicas que el sondeo central descrito anteriormente.

En el caso de la cueva de El Mirador, a diferencia de San Cristóbal, Los Husos y Peña Larga, los restos óseos de especie animal encontrados en los niveles excavados son abundantes y la mayoría de origen ovicaprino. Además, la cantidad de restos óseos neonatos encontrados en el sector 200 es mayor que en el sector 100. Esta curiosidad,

hace pensar a los arqueólogos, la posibilidad de que el pastor separase las reses dependiendo del estado gestacional y/o que tras el parto las madres con sus crías fuesen separadas del resto.

Por todo ello, el objetivo principal en este yacimiento no es la determinación de la naturaleza del animal estabulado, que es interesante pero no fundamental en este caso, sino establecer si realmente se estabulaban las hembras parturientas y paridas separadas del resto del rebaño junto con sus crías. Para ello, se desarrolló un método analítico de extracción y análisis conjunto de hormonas, ácidos biliares, esteroides y fitoesteroides mediante microondas y LC-MS. Este nuevo método permitirá determinar el origen animal de los restos, al igual que en el resto de los yacimientos, y establecer el aspecto de la separación de las reses, utilizando las hormonas como marcadoras del ciclo reproductivo, la pubertad y abortos.

Del mismo modo, se va a realizar una caracterización de las *facies* mediante pirólisis acoplada a GC-MS para determinar posibles diferencias entre ellas debido a la descomposición de la lignina.

## **5.2 MUESTREO, ALMACENAMIENTO Y HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA**

Se han recopilado un total de 33 muestras de los sectores 100 y 200. En la Tabla 5.2, se describe la nomenclatura, sector, nivel, año y tipo de *facies* de cada una de las muestras recogidas durante los años 2017 y 2018.

Cada una de las *facies* de los diferentes niveles se muestreó con la ayuda de una pala de mortero de acero inoxidable que se lavaba con metanol y agua Milli Q después de la recogida de cada muestra. Todas las muestras se tomaron partiendo de bloques rectangulares de 0,8 m de largo y 0,6 m de ancho.

Mediante esta metodología se obtuvieron cantidades de muestra entre 30 g y 1 kg de las diferentes *facies*. Estas muestras se recogían en papel de aluminio y se guardaban

en bolsas termoselladas de PP, manteniéndose en refrigeración a 4°C durante el muestreo y transporte, conservándose, finalmente, a -82°C hasta su análisis en el laboratorio.

El proceso de homogenización en las muestras de El Mirador, fue el mismo que se realizó con las muestras recogidas en los yacimientos de la Sierra de Cantabria (sección 3.2.2).

**Tabla 5.2:** Muestras analizadas del yacimiento arqueológico del El Mirador donde se detalla el sector de muestreo, el nivel al que corresponde y el tipo de facies.

Muestra	Sector	Nivel	Episodio	Año (BP cal. 95%)	Tipo de facies		
AM3	100	MIR104		3680-3480	n (carbonosa)		
AM4					tf (cenicienta)		
AM21		MIR105		??	a (n.a.t)		
AM22				a (n.a.t)			
AM1	200	MIR205		5842-5610	g (cenicienta)		
AM2					v (n.a.t)		
AM23					vl (n.a.t)		
AM24					g (cenicienta)		
AM25					tf (cenicienta)		
AM26					tf (cenicienta)		
AM27					v (n.a.t)		
AM5					100	MIR107	1
AM6	tf (cenicienta)						
AM7	2	n (carbonosa)					
AM8		g (cenicienta)					
AM9	m (cenicienta)						
AM10	n (carbonosa)						
AM11	m (cenicienta)						
AM12	g (cenicienta)						
AM13	3	b (cenicienta)					
AM14		tf (cenicienta)					
AM15	n (carbonosa)						
AM16	g (cenicienta)						
AM17	4	tf (cenicienta)					
AM18		n (carbonosa)					
AM19	MIR108			6447-6310		v (n.a.t)	
AM20						vl (n.a.t)	
AM28						v (n.a.t)	
AM29						v (n.a.t)	
AM30					g (cenicienta)		
AM31					a (n.a.t)		
AM32	MIR109			6795-6655	a (n.a.t)		
AM33					b (cenicienta)		

## 5.3 CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS ARQUEOLÓGICAS POR MEDIO DE MW-LC-MS

### 5.3.1 Reactivos y disolventes

Los patrones de las hormonas sexuales, el  $17\beta$ -estradiol (E2, 99,7%), la estrona (E1, 99%), la testosterona (TT, 99,9%) y la progesterona (PG, 99,6%) fueron suministradas por Sigma-Aldrich® (Madrid, España) mientras que el estriol (E3, 99,7%) fue suministrado por Riedel-de Haën (Streiheim, Alemania). Los ácidos biliares, el ácido ursodeoxicólico (Urso, 99%), el ácido quenodeoxicólico (Cheno, 97%), el ácido deoxicólico (Deox, 98%) y el ácido litocólico (Lit, 95%) fueron suministrados por Sigma-Aldrich® (Madrid, España). Los esteroides, el epicoprostanol (EpiCop, 95%), el colesterol (CHOL, 99%), el coprostanol (Cop, 98,5%), el estigmasterol (Stigterol, 95%), el colestanol (Col, 94,8%), el campesterol (Camp, 65%), el  $\beta$ -sitosterol (Sit, 95%) fueron suministrados por Sigma-Aldrich® (Madrid, España), epi- $5\beta$ -Stigmastanol (Stigtanol, 95%) fue suministrado por Chiron AS, Stikkestadveien 1, NO-7041 Trondheim, Noruega, Los análogos deuterados, el estradiol deuterado ( $[^2\text{H}_3]$ -E2, 98%), el ácido litocólico deuterado ( $[^2\text{H}_5]$ -Lit, 98%) y el colesterol deuterado ( $[^2\text{H}_7]$ -CHOL, 98%) fueron suministrados por Sigma-Aldrich® (Madrid, España). El  $\beta$ -sitosterol deuterado ( $[^2\text{H}_7]$ -Sit, 98%) fue suministrado por C/D/N Isotopes (Point Claire, Quebec, Canada).

Los disolventes orgánicos como el metanol (MeOH), diclorometano (DCM) y acetato de etilo (EtOAc) y hidróxido de potasio (KOH) fueron suministrados por Scharlab (HPLC grade, Barcelona, España), Finalmente, el ácido clorhídrico (HCl) fue suministrado por Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido).

### 5.3.2 Extracción asistida por microondas (MAE)

La extracción de las muestras se realizó mediante el método optimizado (sección 2.3.2). Se pesaron 5 g de las muestras homogenizadas en las vasijas del microondas junto



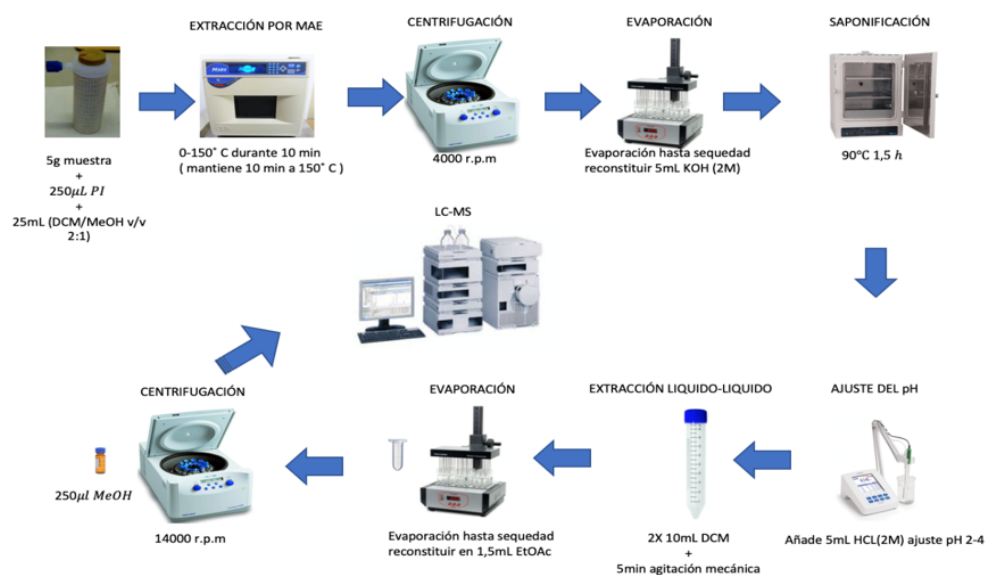
con un imán agitador, A estas muestras, se le añadieron 250 ng de los análogos deuterados y 25 mL de una mezcla 2:1 de DCM/MeOH. Una vez cerrado los vasos de TFM (Chemgreen, 100 mL), la extracción de las muestras se llevó a cabo en un microondas modelo CEM Mars 5 (Matthews NC, USA) a una potencia de 1600W. La extracción se realizó en gradiente de temperatura: subiendo a 150 °C durante 15 min y manteniéndola durante otros 15 min. Una vez finalizada la extracción, todas las muestras se centrifugaron a 4.200 rpm (Allegra™ X-22R Beckman Coulter, Pasadena, USA) y se recogió el sobrenadante para su posterior saponificación.

### **5.3.3 Saponificación**

El extracto procedente de la MAE se evaporó hasta sequedad con un flujo constante de aire sintético, A continuación, se le añadieron 5 mL de una concentración de KOH 2M disuelta en una disolución de MeOH:H<sub>2</sub>O (10:1 v/v) y se le sometió a un tratamiento térmico de 90°C durante un periodo de 1,5 h en tubos cónicos de centrifugación de 25 mL.

### **5.3.4 Extracción líquido-líquido**

Previamente a la extracción líquido-líquido, al extracto saponificado se le añadieron 5mL de una disolución de HCl 2M y a continuación se ajustó el pH entre 2-4. Posteriormente se procedió a realizar una extracción líquido-líquido en dos pasos mediante el uso de 2x10 mL de DCM. Finalmente, los 20 mL fueron evaporados hasta sequedad y reconstituidos en 250 µL de MeOH y tras una centrifugación a 14.000 rpm el sobrenadante fue analizado mediante LC-APCI-MS. En la Figura 5.2 se resumen las diferentes etapas del método analítico desarrollado.



**Figura 5.2.** Resumen de los procedimientos analíticos de tratamiento de la muestra realizados hasta su análisis por LC-MS.

### 5.3.5 Análisis instrumental LC-APCI-MS

La separación cromatográfica de los analitos se llevó a cabo en un sistema LC de Agilent 1290 infinity (Palo Alto, SA, USA). La columna cromatográfica empleada fue una Ascentis®Express (C<sub>18</sub> HPLC, fused-15cm; 3,0mm; 2,7µm) suministrada por Sigma Aldrich® (Madrid, España).

La columna se termostató a 35°C. Se trabajó con elución en modo gradiente y las fases móviles estaban formadas por una fase A de agua-Milli Q y una fase B de MeOH. Fijándose un gradiente de flujo que es el siguiente: 0 min: 35% A y 65% B; 3 min 26,3% A y 73,7% B; 4 min 25% A y 75% B; 8 min 15% A y 85% B, 10 min 1,6%A y 98,4% B; 20 min 0,9% A y 99,1 % B; 22 min 0,0% A y 100% B; 23 min 35% A y 65% B, un flujo constante de la fase móvil de 0,6 mL/min y un volumen de inyección de 1 µL.

El espectrómetro de masas empleado en la detección fue un Agilent LC/MS Mod, 61947 A (Agilent Technology) trabajando en modo de ionización positiva. El control del sistema de LC y la automatización del inyector se hizo bajo control del software de

Agilent Chemstation. El espectrómetro de masas se configuró con una fuente de ionización (APCI) en modo positivo, SIM y los parámetros característicos de la fuente de ionización fueron los siguientes: voltaje del capilar, 3000V; temperatura, flujo y presión del gas de nebulización de 300 °C, 3mL/min y 20 psi respectivamente.

**Tabla 5.3.** *Tiempo de retención, ion cuantificador e ión cualificador de cada uno de los compuestos analizados.*

	TR Tiempo de Retención (min)	Ion Cuantificador	Ion Cualificador
E3	1,46	271,1	253,1
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-E2	2,90	258,2	249,1
E2	2,92	255,2	271,0
E1	3,02	271,1	253,1
TT	3,33	289,2	271,1
Urso	3,97	357,2	358,2
PG	4,98	315,2	313,1
Cheno	7,69	357,2	339,1
Deox	7,86	357,2	355,0
[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-Lit	9,19	364,3	346,3
Lit	9,53	359,3	341,2
EpiCop	14,96	371,3	385,3
[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-CHOL	15,53	376,4	390,3
CHOL	15,61	369,3	383,3
Cop	15,88	371,3	385,3
Stigterol	16,27	409,3	395,3
Col	16,31	371,3	383,2
Camp	16,36	397,3	383,3
[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-Sit	16,98	404,4	418,3
Sit	17,09	397,3	411,2
Stigtanol	17,96	399,3	413,4

### 5.3.6 Parámetros de calidad del método

#### 5.3.6.1 Calibración del método

Se realizó un calibrado en matriz dopando tierras blanco en un rango de concentraciones de los analitos de entre 10-500 ng/g. Estas tierras se reforzó también con 50 ng/g de cada trazador. Conjuntamente, se analizaron tres réplicas de las tierras blanco dopadas con el trazador para asegurar la ausencia de los analitos de interés en la matriz. En el caso de encontrar analitos en la matriz blanco, lo que ocurrió en los casos de CHOL, Camp y Sit, la cantidad encontrada fue restada.

El coeficiente de correlación fue mayor al 0,99 en todos los casos.

### 5.3.6.2 Estudio del efecto matriz

La posible supresión iónica en la ionización de los analitos debido al efecto matriz debe de tenerse en cuenta para evitar errores en la cuantificación. Este fenómeno puede darse durante el proceso final de análisis de las muestras o a lo largo de todo el proceso analítico.

Para determinar el efecto matriz en el análisis y debido a la imposibilidad de encontrar blancos sin ningún analito de interés, se usaron los analitos marcados isotópicamente ( $[^2\text{H}_5]$ -Lit,  $[^2\text{H}_3]$ -E2, ( $[^2\text{H}_7]$ -CHOL,  $[^2\text{H}_7]$ -Sit).

Para determinar el efecto matriz del proceso se analizaron blancos de matriz dopados con 50 ng/g de cada uno de los uno de los análogos deuterados, blancos sin matriz dopados con 50 ng/g de cada uno de los análogos deuterados y blancos sin dopar con y sin matriz. Se calculó la concentración de cada uno de los análogos deuterados y se utilizó la ecuación 5.1 para determinar el efecto matriz en el proceso.

$$\text{Efecto matriz proceso (\%)} = \frac{C_{\text{blanco matriz dopada}} - C_{\text{blanco matriz}}}{C_{\text{blanco dopado}} - C_{\text{blanco}}} \times 100 \quad \text{Ec. 5.1}$$

Haciendo uso de la ecuación 5.1 puede observarse que para  $[^2\text{H}_5]$ -Lit (25,1%), como para  $[^2\text{H}_3]$ -E2 (70,8%), existe una clara supresión negativa en ambas, por el contrario, tanto para  $[^2\text{H}_7]$ -CHOL (140,4%), como para  $[^2\text{H}_7]$ -Sit (146,4%) la supresión fué positiva. En vista de los resultados obtenidos y con el objeto de minimizar las distorsiones que pueda provocar el efecto matriz se decidió utilizar una curva de calibrado en matriz junto con la utilización de patrones internos y se determinó la recuperación de los analitos a dos niveles de concentración.

### 5.3.6.3 Recuperación del método para concentraciones altas y bajas

Otro criterio de calidad importante para evaluar un método analítico es el de comprobar la recuperación de cada uno de los analitos cuando estos se encuentran tanto a concentraciones bajas como altas.

Para ello, se utilizaron los  $C_{LOD}$  de cada uno de los analitos (sección 4.3.6.4), usándose  $C_{LOD} \times 2$  como concentraciones bajas y  $C_{LOD} \times 10$  como concentraciones altas.

Se obtuvieron recuperaciones aparentes entre 71%-149% a excepción del Sit donde las recuperaciones fueron del 30% y del 52% para las concentraciones bajas y altas respectivamente.

**Tabla 5.4** Recuperaciones del método analítico a concentraciones altas, bajas y cálculo de la desviación estándar relativa (DER).

Analitos	Rec, Conc, Bajas (%)	DER (%)	Rec, Conc, Altas (%)	DER (%)	$C_{LOD}$ (ng/g)	$C_{LOQ}$ (ng/g)
E <sub>1</sub>	71	8	123	13	8	25
E <sub>2</sub>	82	15	112	2	0,5	1,8
E <sub>3</sub>	95	10	107	3	4,5	14,5
TT	92	21	100	19	0,5	2
Urso	127	9	78	12	36,5	122
PG	102	19	74	24	18	62
Cheno	111	24	120	10	3,5	11
Deox	78	10	65	9	29	95
Lit	119	12	129	9	9	30
EpiCop	119	19	69	7	7	22
CHOL	149	25	76	5	24	79
Cop	115	4	87	4	21	69
Stigtenol	137	12	86	11	7	24
Col	82	23	128	7	19	64
Camp	124	8	92	17	16	55,5
Sit	30	3	52	5	61	175,5
Stigtanol	87	5	101	20	10,5	35

### 5.3.6.4 Cálculo de los límites de detección y cuantificación

Para determinar los LODs y LOQs de los analitos de interés se utilizaron 5g de una matriz blanco dopada con 50 ng/g de los analitos marcados isotópicamente ( $[^2H_5]$ -Lit,  $[^2H_3]$ -E2,  $[^2H_7]$ -CHOL,  $[^2H_7]$ -Sit). En el caso del CHOL, debido a su presencia en gran cantidad en el blanco matriz, se utilizó la señal de un blanco del proceso sin matriz como

señal para determinar sus límites. Para el cálculo de los diferentes límites se han utilizado dos criterios diferentes (Tabla 5.4).

- Cuando no había señal en el blanco: tanto la  $S_{LOD}$  como la  $S_{LOQ}$  fueron calculados con el ratio señal ruido S/N 3:1 y 10:1 respectivamente.
- Cuando se observaba señal en el blanco: en este caso tanto la  $S_{LOD}$  como la  $S_{LOQ}$  se calcularon haciendo uso de la señal y la desviación estándar tal como se observa en la ecuación 3.6 y 3.7.

$$S_{LOD} = \bar{S} + 3s \quad y \quad S_{LOQ} = \bar{S} + 10s \quad (\text{Ec. 3.6 y 3.7})$$

### 5.3.7 Análisis de las muestras reales

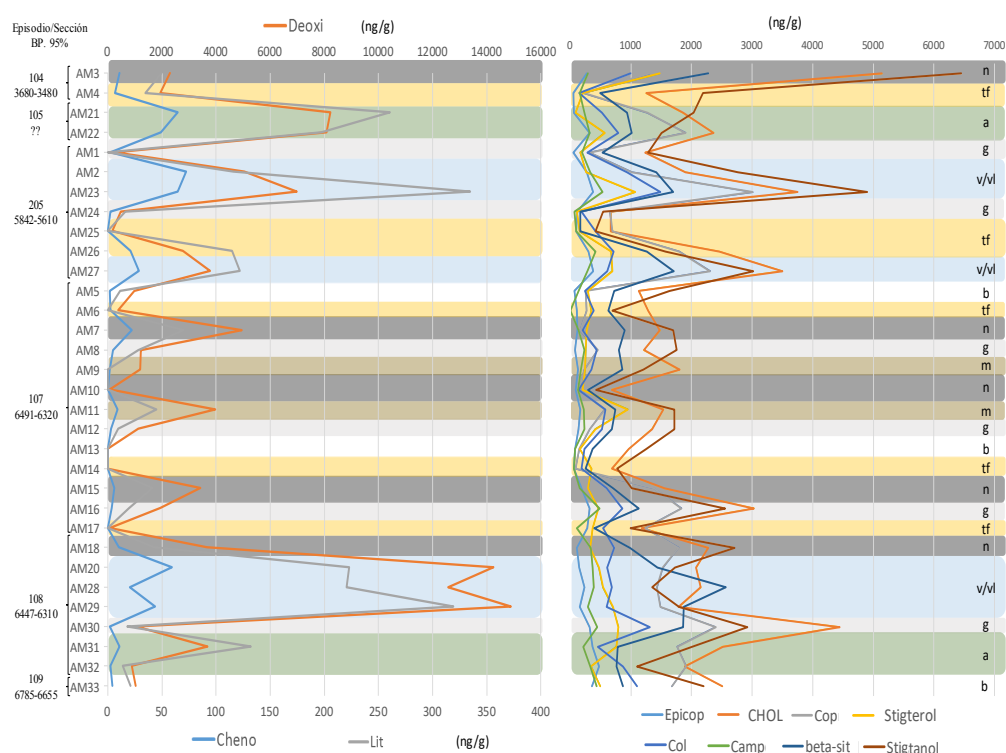
#### 5.3.7.1. Identificación biogénica de las muestras

Se analizaron treinta y tres muestras de carácter sedimentológico (*fumiers*) provenientes de las excavaciones realizadas en rediles prehistóricos localizados en la cueva de El Mirador (Atapuerca, Burgos, España) desde el Neolítico hasta el Bronce Medio.

Tal como se observa en la Figura 5.3 las concentraciones de los ácidos biliares y esteroides son diferentes en cada una de las *facies*.

En el caso de los ácidos biliares se observan concentraciones altas en las *facies* sin combustión v/vl (AM23, AM20, AM28 y AM29) y a (AM21 y AM22) concentraciones medias en las *facies* parcialmente combustionadas (AM11), negras (AM7 y AM15) y marrón (AM26), y finalmente, concentraciones bajas en las *facies* totalmente combustionadas (AM24, AM5, AM8, AM12, AM16 y AM 30, AM13 y AM33). Parece además, observando las *facies* a y v/vl, que en el sector 108 (AM20, 28 y 29) hubo mayor actividad pastoril que en el resto, debido a la mayor concentración de ácidos biliares y siendo muestras más antiguas, simplemente por degradación, debería haber menor concentración de ácidos biliares si hubiese habido menor o igual actividad.

Con respecto a los esteroides (Figura 5.3) desde las *facies* AM4 hasta la AM14, el comportamiento es similar al de los ácidos biliares: concentraciones altas en las facies sin combustión v/vl (AM21, AM22, AM2, AM23 y AM27), concentraciones medias en facies parcialmente combustiónadas m (AM9 y AM11) y n (AM7 y AM10,) y concentraciones bajas en facies totalmente combustiónadas, g (AM1, AM24, AM12) y b (AM5, AM13) y tf (AM4, AM25, AM6 y AM14). Sin embargo, a partir de la muestra AM15 del nivel 107 este comportamiento es aleatorio.



**Figura 5.3** Concentraciones de los principales esteroides y ácidos biliares en las diferentes facies del yacimiento arqueológico de El Mirador, Deox eje superior, Cheno y Lit eje inferior.

Se encontraron esteroides y ácidos biliares (Tabla 5.5) en muchas de las muestras, lo que corrobora los estudios arqueológicos sobre los restos de origen animal. De entre todos los compuestos analizados destacan el Deox, Stigtanol y CHOL, por el contrario,

en ninguna de las muestras se ha detectado Urso (Tabla 5.5). Este compuesto es característico de la especie porcina <sup>10</sup>, por lo que su no detección junto con la ausencia de restos óseos en los diferentes estratos puede descartar el uso de esta especie como animal de estabulación durante ese periodo.

Una vez clasificados los restos como restos heces de animales, el siguiente paso consistió en determinar el tipo de especie animal estabulado. Para ello se utilizaron dos ecuaciones, un ratio entre esteroides Eq. 3.1 y otro ratio entre ácidos biliares Eq 3.3 ver Tabla 5.5. Se decidió no utilizar la Eq. 3.2 ya que se obtenían resultados más contradictorios que con estas dos.

Mediante la Eq. 3.1 se ha realizado una relación entre los dos principales esteroides de origen animal (Cop y EpiCop) y el esteroide principal de origen vegetal (Stigmasterol). En todas aquellas muestras que como resultado los valores se encuentran por debajo de 1 se caracterizaron como heces de origen animal pertenecientes a rumiantes (AM23, AM27, AM5, AM6, AM7, AM8, AM9, AM10, AM11, AM12, AM13, AM14, AM16, AM18, AM20, AM29, AM 30 y AM33). Por el contrario, los resultados que se encuentran por encima de 1, entre las que estarían las muestras AM22, AM24, AM25, AM26, AM15, AM17, AM28 y AM31, se caracterizan como heces de origen animal perteneciente a omnívoro.

Mediante la ecuación 3.3 en la que se realizó un ratio entre los dos principales ácidos biliares, todos aquellas que se encuentra por encima del 10, se han caracterizado como heces de origen animal perteneciente a rumiante (AM3, AM4, AM21, AM22, AM2, AM24, AM23, AM26, AM27, AM5, AM7, AM8, AM11, AM12, AM15, AM16, AM18, AM20, AM28, AM29, AM30, AM31, AM32 y AM33) (Tabla 5.6 color verde). Las muestras AM6, AM9 y AM10, son clasificadas como heces de origen animal pertenecientes a rumiante por la Eq. 3.1. Por otro lado, al estar las concentraciones de Lit por debajo de su límite de detección, la Eq. 3.3 no es viable. Sin embargo, la presencia de Deox hace presagiar que aun sin la posibilidad de cuantificar Lit, la concentración de Deox es mucho mayor a la de Lit, con lo que se asume que las *facies* donde no se puede cuantificar Lit pero hay presencia de Deox el origen de las muestras, son de origen de rumiantes. Por consiguiente, se ha considerado que las muestras AM6, AM9 y AM10 son



de origen de animal rumiante. El caso de la muestra AM31, la Eq 3.1 genera un valor =1 y la Eq. 3.3 uno mayor que 25, lo que se ha considerado de origen rumiante.

Entre este tipo de *facies* caracterizadas como de rumiante, aparecen *facies* de todo tipo, negras, marrones, v/vl, grises, blancas o tutti-frutti (Tabla 5.5). Curiosamente, y contrario al yacimiento de San Cristóbal, donde sólo se caracterizaban *facies* negras y marrones, en el caso de El Mirador son más las que se pueden caracterizar. Sin embargo, las altas temperaturas sometidas a las *facies* blancas y grises, hace pensar en que el origen de los compuestos en este tipo de *facies* pueda estar originada por la lixiviación de *facies* superiores. De hecho, las *facies* blancas y grises donde se observa actividad de rumiantes, vienen precedidas de una negra o una v/vl.

**Tabla 5.5** Análisis de las muestras arqueológicas del yacimiento de El Mirador, concentraciones en ng/g de esteroides y ácidos biliares; caracterización de las muestras aplicando las ecuaciones 3.1 y 3.3. En color verde coincidencia en las dos ecuaciones.

BP (95%)	Muestra		Nivel	ng/g							Ec. 3.1		Ec. 3.3		Tipo Facies
	AM3	AM4		Cop	EpiCop	Stigتانول	Lit	Deox	Cheno	(Cop+EpiCop)/Stigتانول	Deox/LIT				
3680-3480	AM3		104	1304	273	6454	50	2306	11	Rumiante (0,24)	Rumiante (46)	n			
	AM4			217	50	2187	35	1926	7	Rumiante (0,12)	Rumiante (55)	tf			
??	AM21		105	1270	55	2035	260	8227	65	Rumiante (0,65)	Rumiante (32)	a			
	AM22			1902	315	1503	197	8073	49	Omnívoro (1,48)	Rumiante (41)	a			
5842-5610	AM1		205	315	49	1285	<LOD	265	3	Rumiante (0,28)	Rumiante (No Lit)	g			
	AM2			1012	272	2771	116	5041	72	Rumiante (0,46)	Rumiante (43)	V			
	AM24			652	115	538	16	476	2	Omnívoro (1,43)	Rumiante (30)	g			
	AM25			694	92	416	<LOD	170	<LOD	Omnívoro (1,89)	Rumiante (No Lit)	tf			
6491-6320	AM23		107	3011	372	4900	335	6979	64	Rumiante (0,69)	Rumiante (21)	VL			
	AM26			1795	294	1570	115	2780	21	Omnívoro (1,33)	Rumiante (24)	tf			
	AM27			2308	377	3019	122	3788	29	Rumiante (0,89)	Rumiante (31)	V			
6491-6320	AM5		107	252	64	1636	11	985	2	Rumiante (0,19)	Rumiante (89)	b			
	AM6			268	110	690	<LOD	385	2	Rumiante (0,55)	Rumiante (No Lit)	tf			
	AM7			161	113	1693	70	4953	22	Rumiante (0,16)	Rumiante (71)	n			
	AM8			452	75	1752	28	1221	5	Rumiante (0,30)	Rumiante (44)	g			
	AM9			229	126	1208	<LOD	1183	2	Rumiante (0,29)	Rumiante (No Lit)	m			

Tabla 5.5 (Continuación)

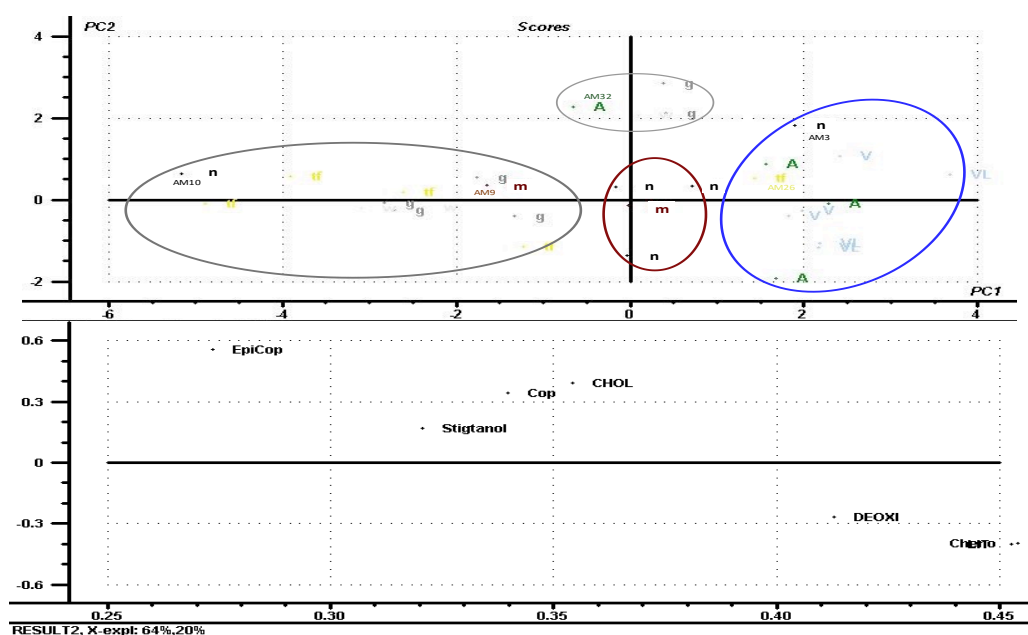
BP (95%)	Muestra	Nivel	ng/g						Ec. 3.1		Ec. 3.3		Tipo Facies
			Cop	EpiCop	Stigتانول	Lit	Deox	Cheno	(Cop+EpiCop)/Stigتانول	Deox/LIT			
6491- 6320	AM10	107	148	86	425	0	81	<LOD	Rumiante (0,55)	Rumiante (No Lit)	n		
	AM11		569	161	1718	45	3971	9	Rumiante (0,42)	Rumiante (89)	m		
	AM12		320	134	1719	10	1115	3	Rumiante (0,26)	Rumiante (115)	g		
	AM13		146	81	1255	<LOD	<LOD	<LOD	Rumiante (0,18)	??	b		
	AM14		86	61	775	<LOD	<LOD	<LOD	Rumiante (0,19)	??	tf		
	AM15		1383	182	1013	41	3424	6	Omnívoro (1,55)	Rumiante (83)	n		
6447- 6310	AM16	108	1832	317	2551	19	1945	4	Rumiante (0,84)	Rumiante (100)	g		
	AM17		1234	276	997	<LOD	71	<LOD	Omnívoro (1,51)	Rumiante (No Lit)	tf		
	AM18		1786	110	2705	42	3656	10	Rumiante (0,70)	Rumiante (87)	n		
	AM20		1526	144	1730	223	14250	59	Rumiante (0,97)	Rumiante (64)	VL		
	AM28		1429	234	1351	221	12571	20	Omnívoro (1,23)	Rumiante (57)	V		
	AM29		1489	155	1791	319	14886	44	Rumiante (0,92)	Rumiante (47)	V		
6795- 6655	AM30	109	2399	315	2918	18	1053	2	Rumiante (0,93)	Rumiante (59)	g		
	AM31		1764	362	2009	132	3670	11	Omnívoro (1,06)	Rumiante (28)	a		
	AM32		1914	477	1097	14	876	3	Omnívoro (2,18)	Rumiante (63)	a		
	AM33		1675	353	2200	21	1028	4	Rumiante (0,92)	Rumiante (50)	b		

En varias muestras, las dos ecuaciones obtienen resultados contradictorios. Varias de estas corresponden a *facies* grises o tutti-frutti (AM24, AM25, AM17, AM32). En esta *facies* las concentraciones de los analitos disminuyen mucho (Figura 5.3) y al igual que el resto de las *facies* de este tipo están precedidas por negras, marrones o v/vl y han sufrido altas temperaturas de combustión, lo que vuelve a hacer suponer que los compuestos encontrados en estas *facies* proceden de *facies* superiores. Además, las muestras AM13 y AM14, blanca y tutti-frutti respectivamente, no contienen ningún resto de ácidos biliares, aunque la Eq. 3.1 catalogue las *facies* como de rumiantes. Por todo ello, el uso de *facies* “blancas, grises, tutti-frutti o a” no parece aconsejable para determinar el origen de especie animal estabulada.

Otras muestras, como las AM22(V), AM26(m), AM15(n), AM28(V) también generan resultados contradictorios. En todas ellas, la Eq. 3.1 las cataloga como restos de omnívoros, mientras que la Eq. 3.3 como de rumiantes. A diferencia de los Husos donde los valores de EpiCop se encuentra por debajo del LOD, en El Mirador, se encuentra en todas las *facies* analizadas. Esto hace pensar que parte del Stigtanol se haya podido epimerizar (Epi-stigtanol) también. Al no disponer de ese compuesto comercialmente no se ha podido cuantificar y al poder incluirlo en la ecuación, tal vez el resultado influya en la clasificación de las *facies*. Sin embargo, en el yacimiento de San Cristobal, la concentración de EpiCop era mayor que el propio Cop, y la ecuación clasificaba las *facies* negras y marrones como de rumiantes. Estos resultados deben compararse con estudios zooarqueológicos y micromorfológicos para llegar a conclusiones para obtener resultados concluyentes.

Sin embargo, para determinar si el comportamiento de las muestras AM22(V), AM26(m), AM15(n), AM28(V) y del resto era similar, se realizó un análisis de componentes principales a todas las muestras (Figura 5.4). Para este análisis se han utilizado las concentraciones logarítmicas de los esteroides, fitoesteroides y ácidos biliares más característicos (Cop, EpiCop, CHOL, Stigtanol, Deox, Lit y Cheno). El PC2 vs PC1 describe el 84% de las muestras. Se observa como las muestra v/vl se agrupan conjuntamente con las muestras AM26(tf) y la AM3(n), lo que determina su mismo comportamiento. Teniendo en cuenta esto último y que la mayoría de esas muestras se

consideran de origen de rumiante, se ha considerado que todas ellas tienen ese origen. Por otro lado, se observan tres agrupaciones más, marrones y negras, y dos con las blancas, grises y tutti-frutti conjuntamente con una negra (AM10) y una marrón (AM9). Se puede considerar, que el PC1 agrupa las muestras según su temperatura de combustión.



**Figura 5.4** Análisis del componente principal (PCA) de las diferentes facies y el logaritmo de las concentraciones de las variables normalizadas (EpiCop, Cop, CHOL, Deox, Lit y Cheno); agrupamiento de los diferentes tipos de facies y su distribución a lo largo del plot en función de la temperatura de combustión.

Con el mismo criterio anterior, se realizó un análisis de componentes principales a las muestras agrupadas en el círculo azul (Figura 5.5)

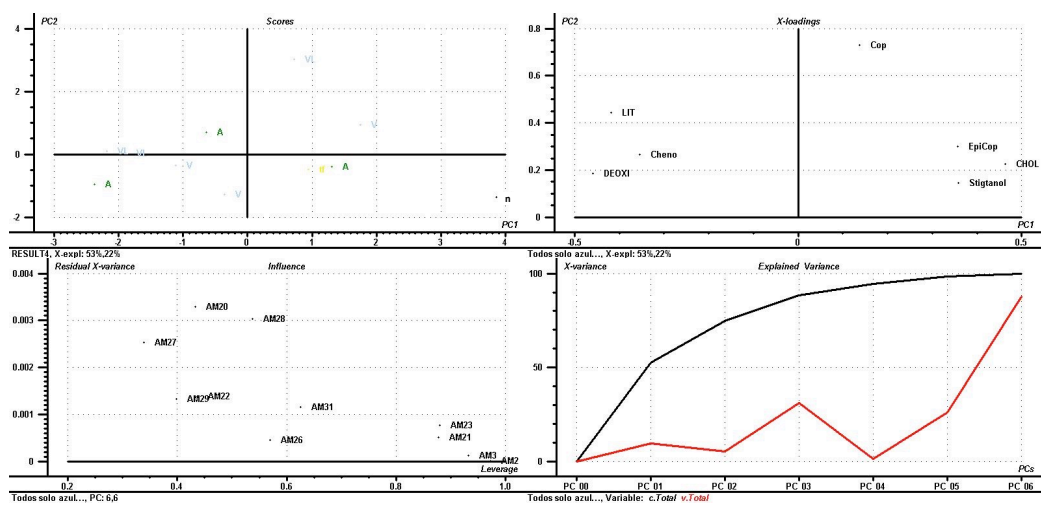
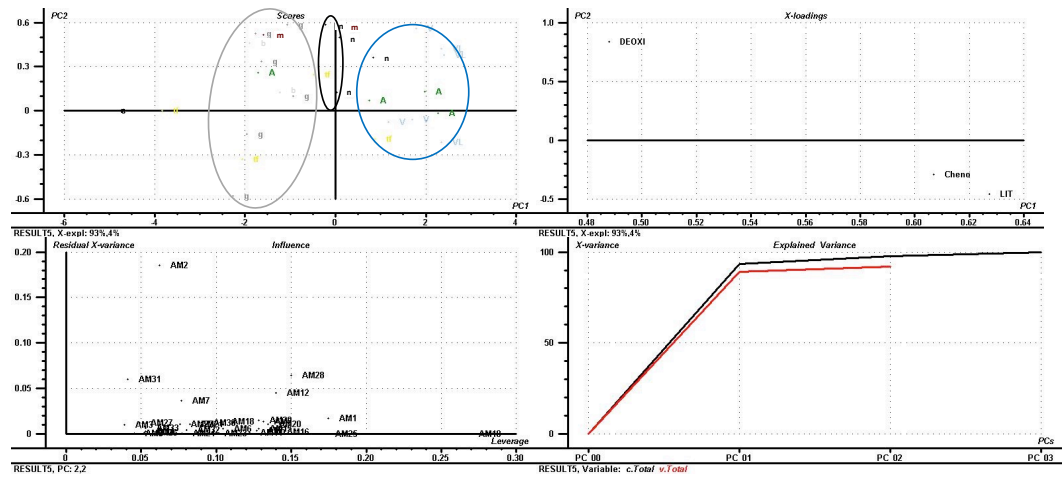


Figura 5.5 PCA de las muestras agrupadas en color azul en la Figura 5.4.

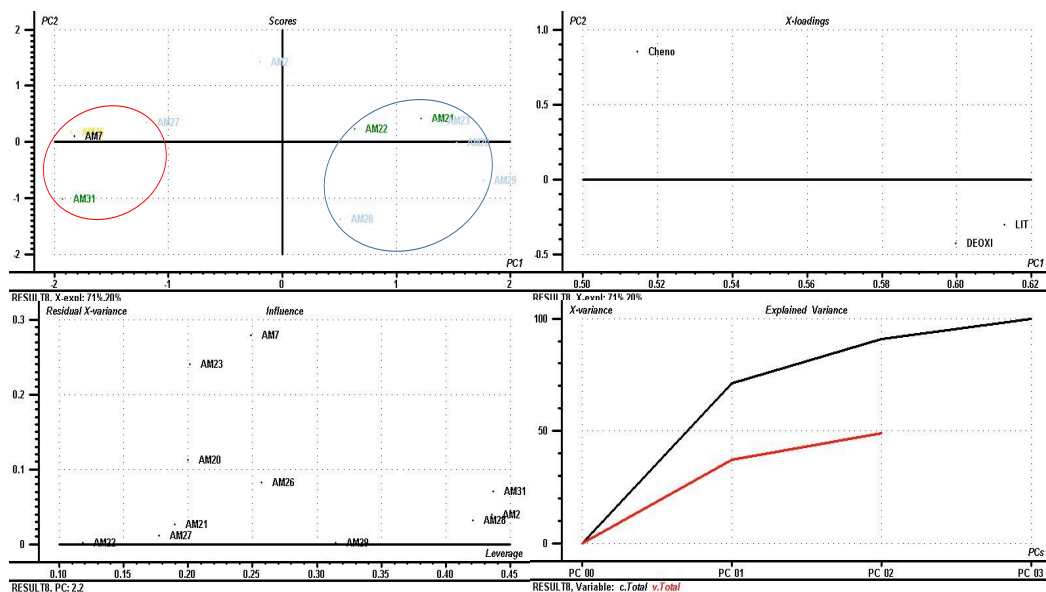
En este análisis, la varianza explicada no es adecuada, con lo que teniendo en cuenta el comportamiento de los esteroides y fitoesteroides a lo largo de los diferentes niveles, se decidió realizar el mismo análisis multivariante, utilizando únicamente los ácidos biliares.

En la Figura 5.6 se observa de nuevo, las mismas agrupaciones que en la Figura 5.4. aunque la explicación es mayor: 97%.



**Figura 5.6** Análisis del componente principal (PCA) de las diferentes facies y el logaritmo de las concentraciones de las variables normalizadas de los ácidos biliares (Deox, Lit y Cheno).

Si se realiza el análisis únicamente con las muestras del círculo azul, (Figura 5.7), se puede observar dos grupos con comportamiento diferente. Estas agrupaciones no coinciden con las muestras con resultados contradictorios. Por tanto, esta agrupación se debe a un origen diferente de las heces o a una actividad pastoril diferente.



**Figura 5.7** Análisis del componente principal (PCA) de las muestras del círculo azul de la Figura 5.6 y el logaritmo de las concentraciones de las variables normalizadas de los ácidos biliares (Deox, Lit y Cheno).

Con intención de clarificar el porqué del mismo comportamiento entre las *facies* no alteradas térmicamente y las de *facies* térmicamente alteradas como la AM26 (tf) y la AM7 (n) se realizó un análisis semicuantitativo de composición mineral mediante Difracción de Rayos X (XRD) de varias *facies*, seleccionadas dependiendo de su agrupación (Tabla 5.6, y Anexo I). Todas las muestras están compuestas de cuarzo, calcita, filosilicatos y apatito, composición de una tierra normal.



**Tabla 5.6** Muestra analizadas mediante Difracción de Rayos X (XRD). Resultados semicuantitativos. Se muestra el porcentaje de abundancia según el compuesto más abundante. Suma de todos %100.

Grupo	Facies	Muestra	%Cuarzo	%Calcita	%Filosilicatos	%Apatito	%Feldespato	%Plagioclasas
Agrupación azul	V	AM2	34	17	48	indicios	1	
	VL	AM23	43	4	52	1		
	V	AM27	32	20	41	3	2	2
	V	AM28	30	9	57	3	1	indicios
	tf	AM26	36	19	40	2	1	2
	n	AM7	28	9	61	2	indicios	
	A	AM22	33	32	30	5	indicios	
Agrupación negra	m	AM11	27	36	28	7	2	
Agrupación gris	A	AM32	25	33	28	12	2	
	m	AM9	27	35	28	10		
	g	AM16	25	41	27	7		
	b	AM5	21	40	26	13		
	b	AM33	11	78	6	4	1	
	g	AM1	39	20	29	7	4	1
SA	n	AM10	25	27	43	5		
	tf	AM25	31	19	39	11		

Sin embargo, las muestras de la misma agrupación tienen una composición similar de minerales de la Figura 5.8. Por ejemplo, la agrupación azul de la Figura 5.8 está compuesta mayoritariamente de filosilicatos, seguida de cuarzo y calcita mientras que la agrupación gris y negra componen una nueva agrupación (amarilla) donde el compuesto mayoritario es la calcita seguida de un porcentaje similar de filosilicatos y cuarzo y de menor medida de apatito.



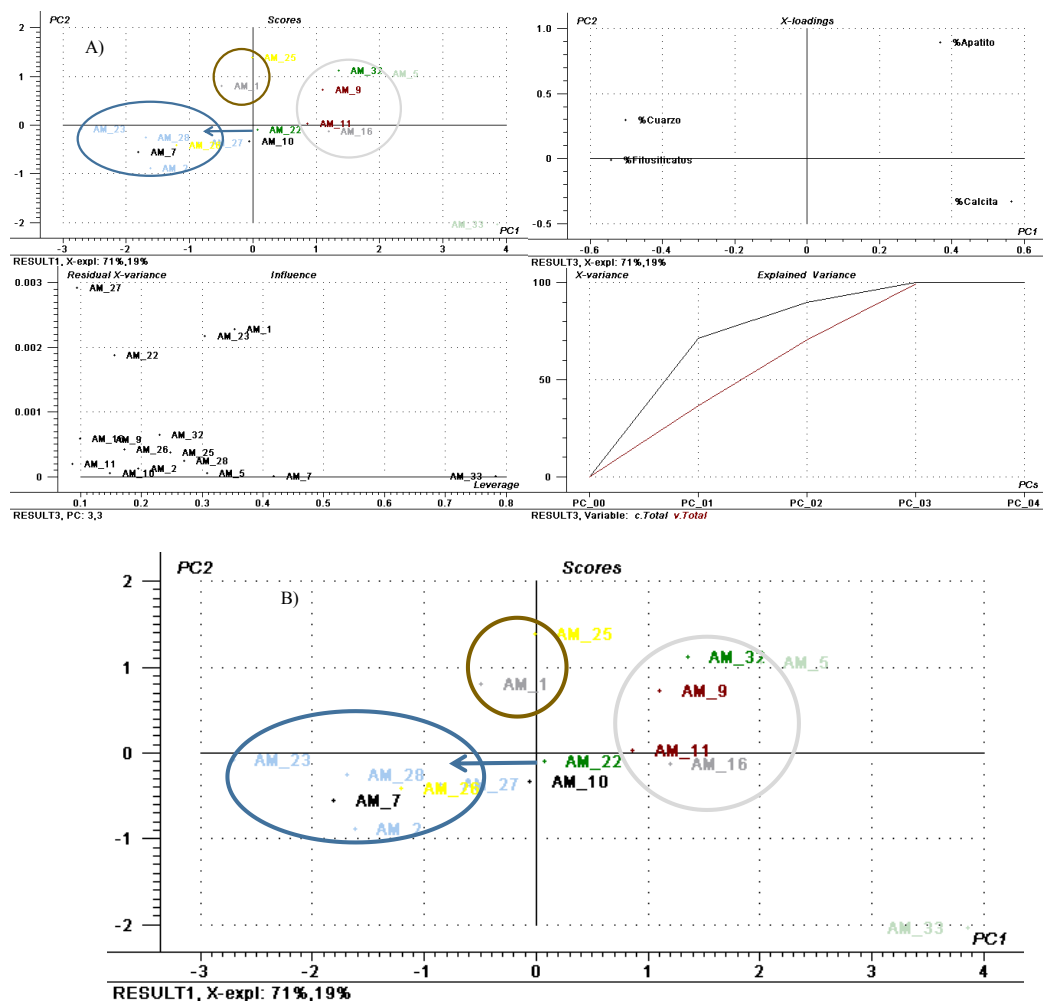


Figura 5.9. A) Análisis de Componentes Principales de los porcentajes de mineral obtenidos mediante XRD. B) Zoom de los Scores.

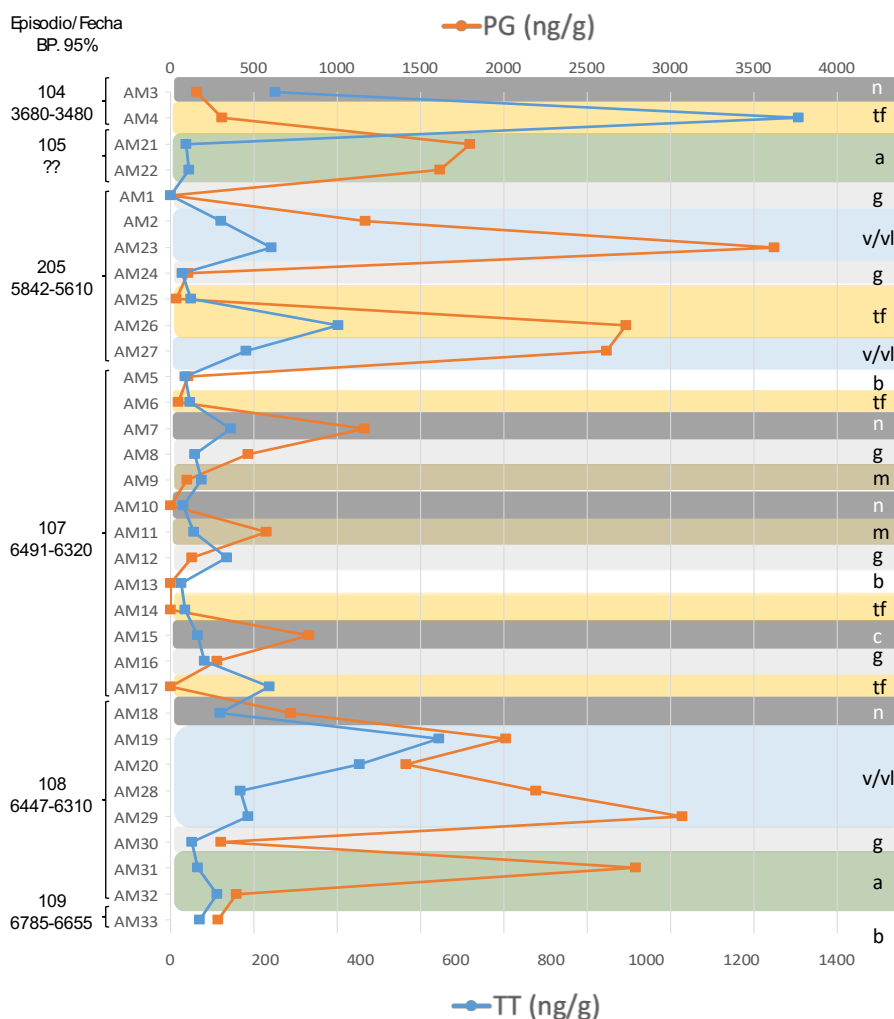
Se puede concluir que la composición mineral tiene influencia en la acumulación de compuestos orgánicos y que independientemente de su catalogación visual de las *facies*, es interesante realizar un análisis de XRD previo al análisis orgánico de las muestras para decir cuales analizar y cuáles no, ya que únicamente con la catalogación visual realizar un descarte de las muestras podría suponer la pérdida de información importante.

Se ha realizado igualmente un PCA de las muestras agrupadas en el círculo azul para compararlas con las agrupaciones de la Figura 5.7 y no se han obtenido resultados relevantes (datos no mostrados).

### 5.3.7.2. Identificación de prácticas pastoriles de las muestras

En el caso de las hormonas, se ha detectado tanto PG como TT mientras que el resto, E1, E2 y E3 se encuentran por debajo del LOD. La PG es específica de las hembras siendo un buen indicador para confirmar embarazos, ciclo menstrual y la formación y desarrollo del embrión; por el contrario, la TT es la principal hormona masculina y está relacionado con la dominación de grupo<sup>11,12</sup>. En general, su concentración tanto en heces como en orina es pequeña, debido a su transformación y eliminación en forma de sus metabolitos, sin embargo, la acumulación de heces hace posible su detección, Como puede observarse en la Figura 5.10, al igual que con los esteroides y ácidos biliares, se encuentran:

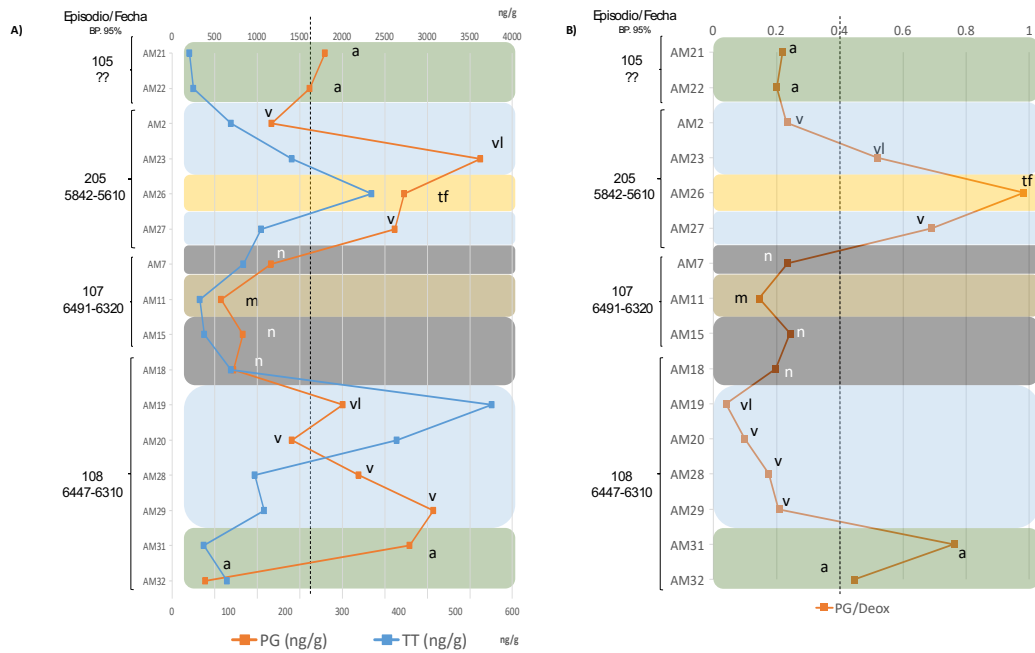
- Concentraciones altas de PG en las *facies* sin combustionar a y v/vl (AM21, AM22, AM2, AM23, AM27, AM19, AM20, AM28 y AM299 y la *facies* tf (AM26).
- Concentraciones medias de PG en las *facies* parcialmente combustionadas n (AM7, AM15 y AM18) y m (AM11).
- Concentraciones bajas de PG en las *facies* totalmente combustionadas cenicientas g (AM1, AM24, AM8, AM12, AM16 y AM30), b (AM5, AM13 y AM33) y tf (AM4, AM25, AM6, AM14 y AM17).
- En el caso de la TT, se encuentran concentraciones altas en *facies* sin combustionar v/vl (AM23, AM27, AM19, AM20, AM28 y AM29), y *facies* tf (AM26 y AM4) siendo esta última curiosamente la que mayor concentración de TT presenta de todas las muestras).
- Concentraciones medias y bajas de TT en el resto de las *facies* parcialmente y totalmente combustionadas, n (AM3, AM7, AM15 y AM18), tf (AM25, AM6, AM14 y AM17), g (AM1, AM12 y AM30) y b (AM5, AM13 y AM33).



**Figura 5.10** Concentraciones de testosterona (TT) y progesterona (PG) en las diferentes facies del yacimiento arqueológico de El Mirador.

Por otro lado, tal como puede observarse en la Figura 5.11A, aunque las concentraciones de PG y TT son diferentes, existe una correlación en las diferentes facies v/vl y m estudiadas, donde aumenta la PG se observa un aumento de la TT y viceversa. Sin embargo, no se puede saber si ese aumento se debe a la mayor acumulación de reses en el establo o a una práctica diferente de pastoreo, como la separación de hembras

embarazadas, recién paridas y sus crías del resto del rebaño. Por lo tanto, es necesaria una normalización de esos resultados. Debido a que si aumenta el número de reses, aumenta la concentración de ácidos biliares o esteroides, se decidió utilizar la concentración de Deox para normalizar los resultados, ya que una vez determinado el origen rumiante de las *facies*, este ácido biliar es el marcador de este tipo de especie animal. En la Figura 5.11B se muestra el ratio PG/Deoxi de las muestras v/vl y marrones. Haciendo uso de este ratio se ha podido detectar mayores valores en las *facies* AM23, AM26 y AM27 del nivel 205 (Figura 5.11B) y en la muestra AM31 del nivel 108.



**Figura 5.11** A) Concentraciones de testosterona (TT) y progesterona (PG) de las facies v/vl y m, B) Relacion PG/Deoxi de las facies v/vl y m, en las diferentes facies del yacimiento arqueológico de El Mirador.

Curiosamente, si se realiza un zoom a la Figura 5.8, en los *scores* ( Figura 5.12) se observa como esas muestras se agrupan en el primer cuadrante de PCA teniendo más influencia la zona positiva del PC2.

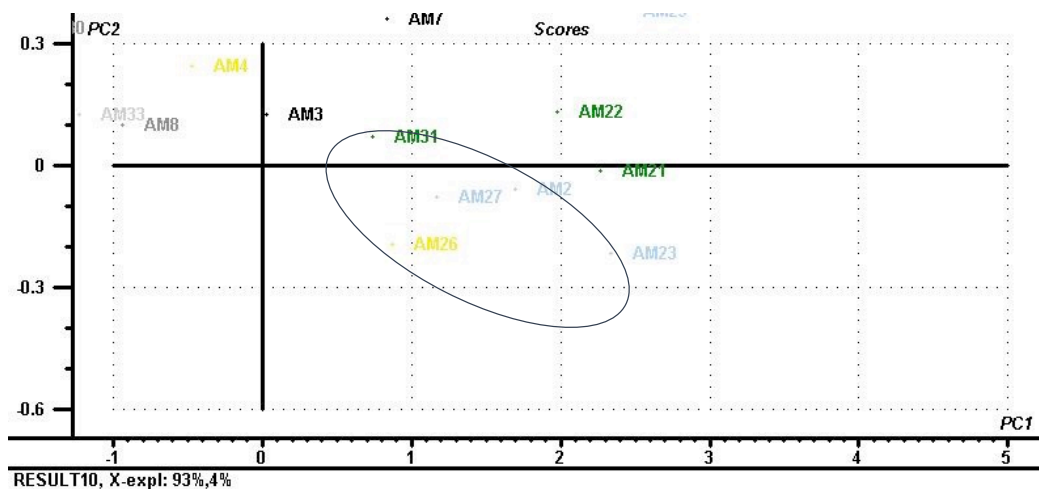


Figura 5. 12 Score donde se puede observar la agrupación de las muestras AM31, AM26 y AM27.

Estos resultados demuestran una mayor actividad hormonal en esa *facies* (AM23, AM26, AM27 y AM31) lo que podría estar relacionado con la separación de hembras embarazadas, recién paridas y sus descendientes del resto del rebaño. Esta última hipótesis debe ser contrastada con los resultados de otros estudios realizados en los mismos niveles, principalmente con los del análisis taxonómico de los restos óseos y con los de la micromorfología de suelos, actualmente en curso.

### 5.3.8 Conclusiones

El análisis de residuos orgánicos es una herramienta de gran importancia en arqueología, utilizada con frecuencia para la caracterización de especies animales. Mediante este estudio y con la intención de ampliar el conocimiento en torno a los establos prehistóricos, se ha presentado una metodología que además de realizar una caracterización de las especies animales, consigue también indagar en las prácticas pastoriles y gestión de los establos prehistóricos, mediante el uso de biomarcadores

habituales como los esteroides y ácidos biliares, a los que se ha incorporado el de las hormonas sexuales, como posible nuevo biomarcador de uso en arqueología.

- En este trabajo se ha conseguido desarrollar una metodología de análisis conjunto de cinco hormonas sexuales (E1, E2, E3, TT y PG), cuatro ácidos biliares (Lit, Deox, Urso, Cheno) y siete esteroides (EpiCop, Cop, Col, Stiganol, Camp, Sit y Stiganol) mediante el empleo de la técnica de extracción por microondas MAE y su análisis mediante LC-MS.
- Se ha conseguido caracterizar las muestras analizadas como heces de origen animal, pertenecientes a rumiantes en su mayoría. Se observa por medio del análisis multivariante como las contradicciones generadas por las ecuaciones se disipan, debido al mismo comportamiento de las facies no combustionadas.
- Se ha observado que con la introducción de los ácidos biliares las agrupaciones obtenidas son similares a cuando se usan todos los compuestos, lo que lleva a pensar que las concentraciones de los ácidos biliares podrían ser suficientes para determinar el origen animal de las heces.
- Se concluye que esas muestras no combustionadas son las útiles para determinar el origen animal de las muestras, ya que el uso del resto puede llevar a error.
- Se debe realizar un análisis previo de XRD para determinar a qué muestras hay que realizar el análisis orgánico y a cuáles no.
- Se ha podido indagar en las prácticas pastoriles en relación a la cría, encontrando mayores valores en un determinado sector del yacimiento lo que puede ser indicativo de una posible separación de las hembras embarazadas, recién paridas y crías del resto del rebaño.



## 5.4 CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS ARQUEOLÓGICAS POR PY-GC-MS

### 5.4.1 Muestreo

Se han analizado nueve muestras de la cueva de El Mirador, perteneciente al Parque y Complejo arqueológico de Atapuerca, Concretamente cinco *facies* negras n y c (AM18, AM3, AM10, AM15, AM7), tres *facies* v/vl (AM19, AM20, AM22) y una *facies* blanca b (AM5).

Todas las muestras han sido secadas en el horno a 90°C durante 3h y con posterioridad ha sido homogenizadas y pulverizadas mediante el uso de una bola de óxido de zirconio (Pulverisatte,23, Fritsch GmbH, Alemania).

### 5.4.2 Instrumentación

Todos y cada uno de los análisis se ha realizado durante el periodo de estancia pre-doctoral en el Departamento de Química y Química Industrial (Pisa, Italia), bajo la supervisión del Prof, Maurizio Persico y la ayuda inestimable de la Prof, Erika Ribechini en régimen de colaboración formativa.

Para el análisis de las muestras se ha utilizado dos tipos diferentes de pirolisis.

- 5150CDS Pyroprobe 5000 Series (CDS Analytical, USA): la temperatura del pirolizador fue de 650 °C y se mantuvo durante 20s. La interfaz del Py-GC se mantuvo a 180 °C, 35mg de muestra fueron introducidas, con la ayuda de un filamento de platino, en el tubo de pirólisis de cuarzo junto con lana de vidrio y 5µL de derivantizante HMDS (hexametildisilazano). Se trabajó en modo *split ratio* de 5:1 y 280 °C para el inyector del GC. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura inicial de 50 °C, 1 min en modo isoterma, rampa 10°C /min a 100°C, 2 min isoterma, rampa de 4 °C /min a 190°C, 1 min en modo isoterma, rampa de 30°C/min hasta 280°C, y finalmente,

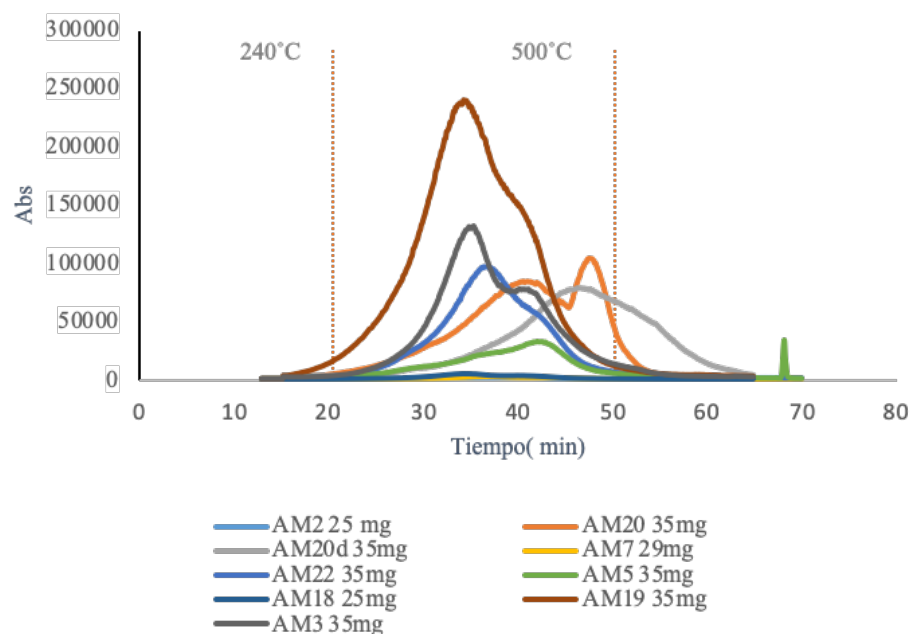
30 min de isoterma. Se empleó (pureza: 99,995%) como gas portador, a un flujo constante de 1 mL/min.

- EGA/PY-3030D Multi-Short micro-furnace pyrolyser (Frontier Lab, Japón). La temperatura inicial del pirolizador es de 50 °C, rampa de temperatura de 12°C/min hasta 800°C y la interfaz del Py-GC se mantuvo a 180 °C, 35mg de muestra con la ayuda de un filamento de platino fueron introducidas en el tubo de pirolización de cuarzo junto con lana de vidrio y 5µL de HMDS, Se trabajó en modo *split ratio* de 20:1 y 300 °C para el inyector del GC. Las condiciones cromatográficas son las siguientes: temperatura inicial de 300°C, 70 min en modo isoterma, Se empleó He (pureza: 99,995%) como gas portador, a un flujo constante de 1 mL/min.

Como agente de derivatizante se empleó 1,3,3,3-Hexametildisilizano (HMDS, 99,9%, Sigma Aldrich Inc, USA). En ambos casos el pirolizador iba conectado al cromatógrafo de gases 6890 Agilent (USA) equipado con inyector split/splitless, columna capilar de sílice fundido HP-5MS (3 m x 0,25mm id Hewlett Packard USA) para la Py-GC-MS y un sistema de transferencia inactivo (2 x 0,32 mm id., Agilent J&W, USA) para EGA-MS. Ambos sistemas están acoplados a un espectrómetro de masas Agilent 5973, modo positivo, SCAN m/z 50-600, fuente de ionización y cuadrupolo con temperaturas de 230 y 150 °C respectivamente.

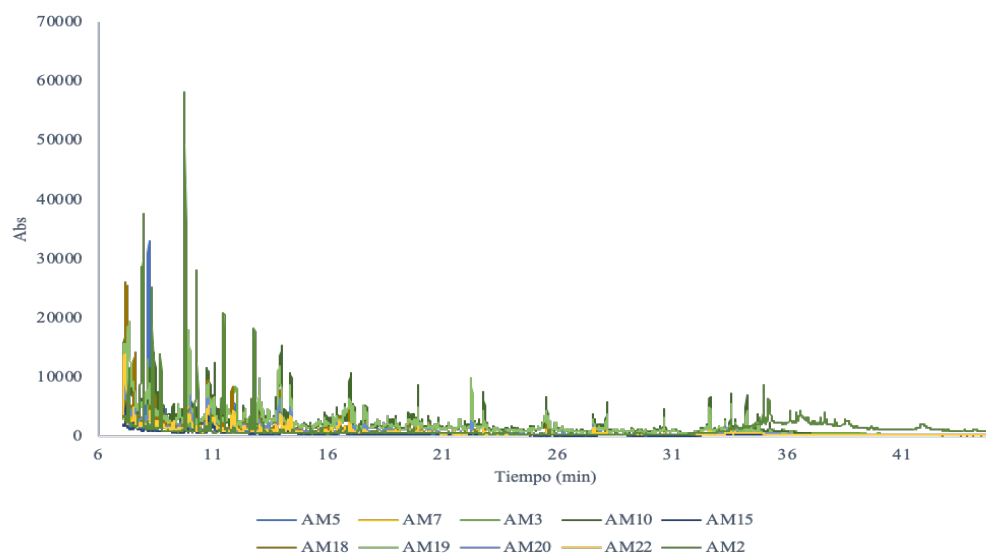
### 5.4.3 Resultados

Tal como podemos observar en la figura 5.13, el perfil pirolítico generado por EGA-MS es mayor en cuanto a la cantidad de volátiles generados en los intervalos de temperaturas de 240 a 500 °C, así mismo, se pueden observar diferencias significativas entre las muestras siendo las muestras v/vl (AM19, AM2) y negra n (AM3) las que mayor señal han generado. Por el contrario, son dos muestras negras n (AM18, AM7) junto con una muestra blanca b (AM5) la que menor señal han aportado.



**Figura 5.13** Perfil pirolítico generado por EGA-MS de 8 muestras arqueológicas de la Cueva de El Mirador perteneciente al Parque y Complejo arqueológico de Atapuerca.

En cuanto al cromatograma generado por PY-GC-MS ver Figura 5.14, se pueden observar la mayor cantidad de compuestos en los intervalos de tiempos de retención de 6,5 y 17 min, no encontrándose cantidades significativas de lignocelulosa en ninguna de las muestras. La ausencia de lignocelulosa puede ser debido a una posible degradación de la misma por la actividad fúngica del hongo de la pudredumbre blanca (*Botrytis cinerea*, *P. chrysosporium*, *Stropharia coronilla*, *P. ostreatus* y *Trametes versicolor*) capaces de degradar con facilidad hemicelulosa y lignina<sup>13</sup>, mediante complejas reacciones de oxidación producidas por enzimas como la peroxidasa de lignina (EC 1,11,1,14) (LiP), peroxidasa de manganeso (EC 1,11,1,13) (MnP) y Lacasa (EC 1,10,3,2)<sup>14,15</sup> que ha podido encontrar en los establos prehistóricos las condiciones óptimas de temperatura, humedad y sustrato para su desarrollo y proliferación.



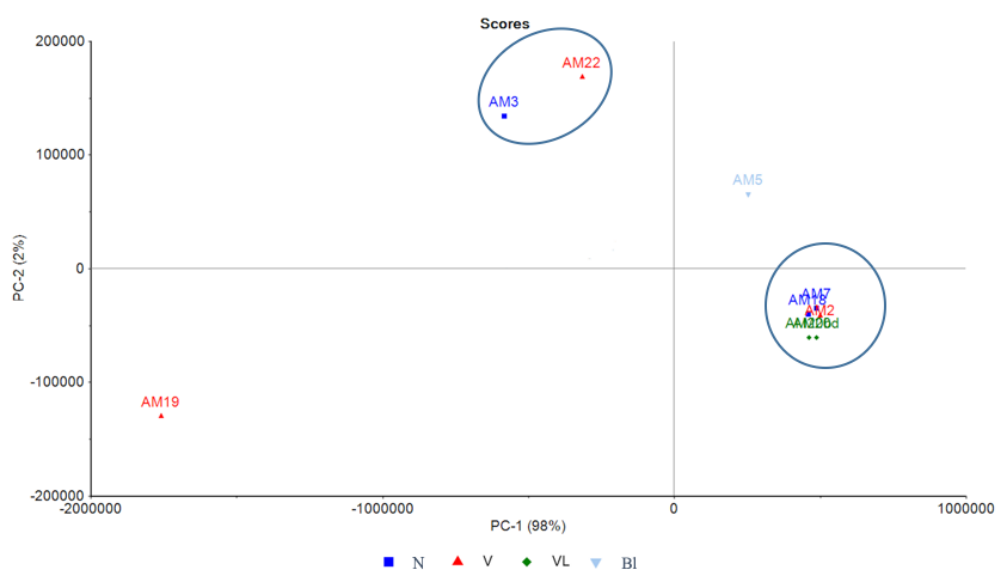
**Figura 5.14** Cromatograma generado por PY-GC-MS de diez muestras arqueológico de la Cueva de El Mirador perteneciente al Parque y Complejo arqueológico de Atapuerca.

#### 5.4.3.1 Estudio quimiométrico en muestras reales

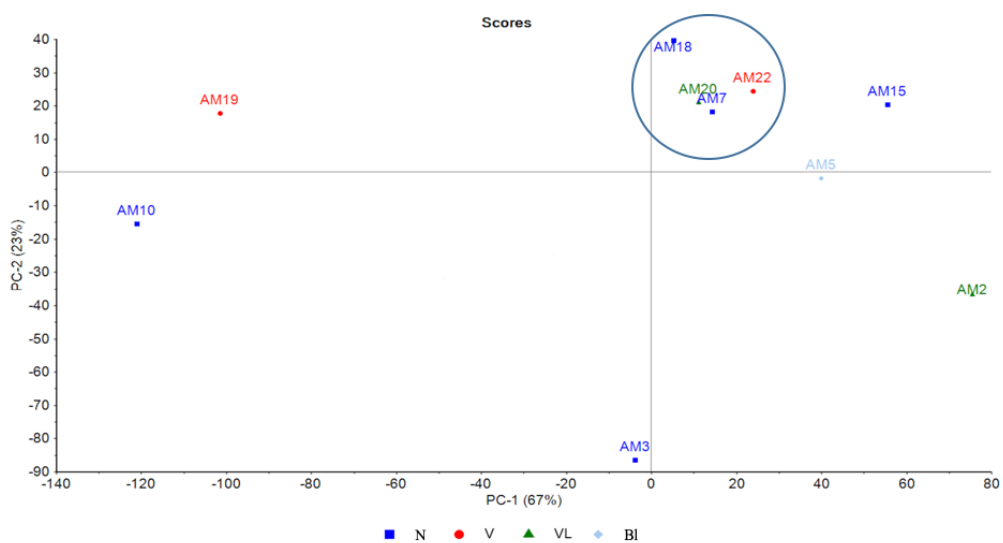
Finalmente, siguiendo el procedimiento del método anterior, se ha procedido a realizar un estudio estadístico multivariante mediante el uso del software The Unscramble 9.7.

Tanto para EGA-MS PY-GC-MS como para PY-GC-MS se han empleado como variables o loadings los tiempos. El número óptimo de varianza acumulada se consigue con los dos primeros PCAs, donde se llega a explicar el 100% para EGA-MS y el 90% para PY-GC-MS. Previamente a este paso se ha procedido al tratamiento de los datos o homogeneización, centrando los mismos mediante la resta del valor medio y finalmente, se realiza un escalado de datos que se realiza dividiéndolo por la desviación estándar.

Tal como podemos observar en la Figura 5.15 para EGA-MS se aprecia una agrupación de las facies negras n (AM7, AM18) y la facies v/vl (AM20 y AM2) con respecto al resto. Por el contrario, para PY-GC-MS en la Figura 5.16 se puede observar una agrupación para las facies negras n (AM7 y AM 18) y v/vl (AM20 y AM22),



**Figura 5.15** Análisis del componente principal (PCA) de las diferentes facies analizadas por EGA-MS y el logaritmo de las variables normalizadas (cada uno de los tiempos); agrupamiento de los diferentes tipos de facies a lo largo del plot.



**Figura 5.16** Análisis del componente principal (PCA) de las diferentes facies analizadas por PY-GC-MS y el logaritmo de las variables normalizadas (cada uno de los tiempos); agrupamiento de los diferentes tipos de facies y su distribución a lo largo del plot.

Haciendo un análisis conjunto de la información se puede decir que son las facies negras n (AM7, AM18, AM20) las que se agrupan con ambos métodos, también se puede

observar que para ambos métodos la *facies* v (AM19) tiene un comportamiento diferente al resto.

Si se comparan estas agrupaciones con las obtenidas con las concentraciones de los analitos y la composición mineral no aparecen similitudes.

Es necesario, continuar estudiando estas muestras y buscar analitos de composición de ligninas en ellas.

#### 5.4.4 Conclusiones

Mediante el análisis por EGA-MS y PY-GC-MS y con la ayuda de técnicas quimiométricas se ha pretendido establecer relaciones entre las diferentes *facies* con el objeto de obtener información útil al estudio, y ya que al tratarse de técnicas que apenas presentan etapas de preparación y el tiempo empleado para el análisis es relativamente corto, podría ser técnicas útiles para realizar estudios preliminares de las muestras.

Sin embargo, no se han obtenido los resultados esperados y es necesario continuar los pirogramas para buscar marcadores que no ayuden a clasificar las *facies*.

## 5.5 BIBLIOGRAFIA

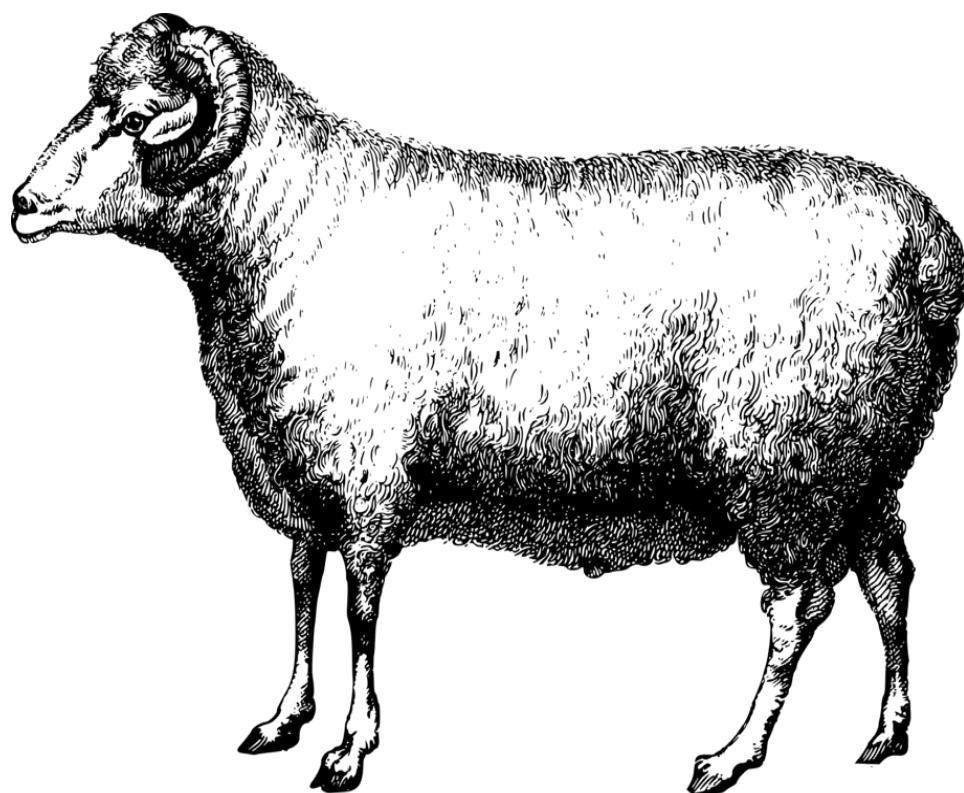
1. Osaba, B., Ruíz De Erenchun, B., 1978. Las cuevas prehistóricas burgalesas en relación con el Museo Arqueológico. *Kaite* **1**, 71–82 (1978).
2. Angelucci, D. E. *et al.* Shepherds and karst: the use of caves and rock-shelters in the Mediterranean region during the Neolithic. *World Archaeology* **41**, 191–214 (2009).
3. Vergès, J. M., Allué, E., Angelucci, D. E., Cebrià, A., Díez, C., Fontanals, M., Manyanós, A., Montero, S., Moral, S., Vaquero, M. and Zaragoza, J. La Sierra de Atapuerca durante el Holoceno: datos preliminares sobre las ocupaciones de la Edad del Bronce en la Cueva de El Mirador (Ibeas de Juarros, Burgos). *Trabajos de Prehistoria*, 59(1): 107–26. (2002)
4. Vergès, J. M., Allué, E., Angelucci, D. E., Burjachs, F., Carrancho, A., C. & A., Expósito, I., Fontanals, M., Moral, S., Rodríguez, A. and Vaquero, M. 2008. Los niveles neolíticos de la cueva de El Mirador (Sierra de Atapuerca, Burgos): nuevos datos sobre la implantación y el desarrollo de la economía agropecuaria en la submeseta norte. In *Actas del IV Congreso del Neolítico Peninsular* (eds M. S. Hernández, J. (2008).
5. Angelucci, D. E. *et al.* Shepherds and karst: the use of caves and rock-shelters in the Mediterranean region during the Neolithic. 191–214 (2009).
6. Carrancho, Á. *et al.* Rock-magnetic analyses as a tool to investigate archaeological fired sediments: A case study of mirador cave (Sierra de Atapuerca, Spain). *Geophysical Journal International* **179**, 79–96 (2009).
7. Carrancho, Á., Villalaín, J. J., Vergès, J. M. & Vallverdú, J. Assessing post-depositional processes in archaeological cave fires through the analysis of archaeomagnetic vectors. *Quaternary International* **275**, 14–22 (2012).
8. Cabanes, D. *et al.* Formation processes through archaeobotanical remains: The case of the Bronze Age levels in El Mirador cave, Sierra de Atapuerca, Spain. *Quaternary International* **193**, 160–173 (2009).
9. Oms, X., Bargalló, A., Chaler, M., Fontanals, M., García, M. S., López, J. M., Morales, J. I. & Nievas, T., Rodríguez, A., Serra, J., Sole, A. and Vergès, J. M. La cova Colomera (Sant Esteve de la Sarga, Lleida), una cueva-redil en el

- Prepirineo de Lérida: primeros resultados y perspectivas de futuro. In Actas del IV Congreso del Neolítico Peninsular (eds M. S. Hernández, J. A. Soler and J. A. López). Alicante: M. (2008).
10. Prost, K., Birk, J. J., Lehndorff, E., Gerlach, R. & Amelung, W. Steroid biomarkers revisited - Improved source identification of faecal remains in archaeological soil material. *PLoS ONE* **12**, 1–30 (2017).
  11. Isobe, N., Nakao, T. & Shimada, M. Fecal Progesterone and Estrone During Pregnancy in a Giraffe: A Case Report. *Journal of Reproduction and Development* **53**, 159–164 (2007).
  12. Shargal, D. *et al.* Fecal testosterone is elevated in high ranking female ibexes (*Capra nubiana*) and associated with increased aggression and a preponderance of male offspring. *Theriogenology* **69**, 673–680 (2008).
  13. Sánchez, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* **27**, 185–194 (2009).
  14. Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen, van R. E. L. & Howard, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* **2**, 602–619 (2015).
  15. Martínez, Á. T. *et al.* Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin Lignocellulosic materials. *International Microbiology* **8**, 195–204 (2005).









Capitulo 6. Análisis de restos actuales y clasificación  
de muestras arqueológicas mediante técnicas  
quimiométricas

---



## 6.1 INTRODUCCIÓN

La caracterización biogénica de las muestras de los yacimientos de Los Husos I y II y de El Mirador es un reto, ya que hasta el momento existe pocos estudios que identifique todas las especies de animales. Prost. et al. publicaron en 2017, varias relaciones entre esteroides y ácidos biliares que eran capaces de identificar diferentes especies de animales a excepción de la oveja y la vaca<sup>1</sup>. Este estudio está basado en la observación de varias especies (vaca, oveja, cabra, caballo, burro, cerdo, oca y humanos) a las que se les controlaba la dieta, por otro lado, Harrault et al. recientemente en 2019 han publicado relaciones entre cuatro  $5\beta$ -estanoles capaces de identificar diferentes especies de animales<sup>2</sup> La comparación de heces actuales con muestras procedentes de *fumiers* es compleja ya que los analitos han sufrido la degradación por impacto térmico y la degradación ocasionada por el paso del tiempo<sup>3-5</sup>, ya que se parte de muestras de 3000 a 7000 años de antigüedad<sup>6-9</sup>. Es por ello, que se van a comparar ratios de los diferentes compuestos<sup>10-13</sup>. Por otro lado, sería interesante determinar si esa degradación es homogénea entre todos los analitos o si afecta más a unos que a otros.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es realizar un método de clasificación biogénica de restos de heces actuales y compararlo con las muestras de los yacimientos de los Husos I y II y el Mirador para su clasificación.

## 6.2 MUESTREO

### 6.2.1. Muestreo de muestras con origen *fumier*

El muestreo se realizó en yacimientos de carácter sedimentológico (*fumiers*) provenientes de las excavaciones realizadas en rediles prehistóricos localizados en la cueva de El Mirador (Atapuerca, Burgos) y en los yacimientos de los Husos I y II (Municipio de El Villar, Rioja Alavesa), todos ellos con dataciones comprendida desde el Neolítico hasta el Bronce Medio. El procedimiento de muestreo de los yacimientos de

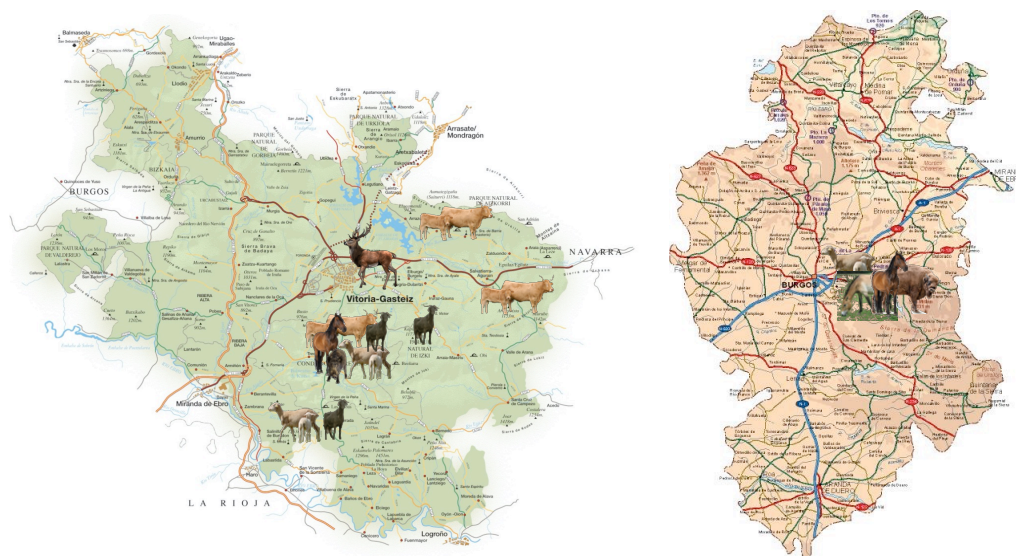
los Husos I y II viene detallado en la sección 3.3.2 y el de la cueva de El Mirador se describe en la sección 5.5.2.

### 6.2.2. Muestreo de muestras de heces actuales

Se recogieron heces de animales de alimentación ecológica, es decir, animales que pastan libres en el monte sin aditivos alimentarios, de diferentes lugares del territorio alavés y burgalés durante la primavera de 2018 (Tabla 6.1. y Figura 6.1). Las muestras recogidas se guardaron en papel de aluminio y bolsas zip a 4°C durante el transporte. Una vez en el laboratorio se homogenizaron, se secaron a 90°C durante 12h y se tamizaron por un tamiz de 60µm y se guardaron a -40°C hasta su análisis.

**Tabla 6.1:** Especie animal y lugar de muestreo.

<i>Especie animal</i>	<i>Lugar de recogida y raza</i>		
<i>Vacas</i>	Aguillo (Condado de Treviño, Burgos) ( <i>Cherolesa con Limusina</i> )	Narvaja (Norte de Araba/Álava)	Opakoa (Noreste de Araba/Álava)
<i>Ovejas</i>	Aguillo ( <i>Rasa Aragonesa</i> )	Laguardia (Sur de Araba/Álava)	Sierra de Atapuerca (Centro de Burgos)
<i>Ciervos</i>	Vitoria-Gasteiz (Centro de Araba/Álava)( <i>Cervus elaphus</i> )		
<i>Cabras</i>	Aguillo ( <i>Extremeña</i> )	Laguardia (XX)	Parque Natural de Izki (Noreste de Araba/Álava)
<i>Caballos</i>	Aguillo ( <i>Hispano-Bretón</i> )	Salgüero de Juarros (Burgos) ( <i>Tarpán</i> )	Salgüero de Juarros ( <i>Przewalski</i> )
<i>Jabalí</i>	Aguillo		
<i>Bisonte Europeo</i>	Salgüero de Juarros		



**Figura 6.1.** Localización de las muestras de heces recogidas durante la primavera de 2018.

### **6.3. Análisis de las de heces actuales.**

#### **6.3.1. Determinación de la concentración de esteroides, fitoesteroides y ácidos biliares**

Para determinar la concentración de esteroides, fitoesteroides y ácidos biliares de las heces actuales se pesaron tres alicuotas (0,1g) de cada una de las muestras recogidas y se utilizó el método analítico desarrollado en el tema 4.

Los resultados obtenidos para cada una de las muestras se pueden observar en la Tabla 6.2.

**Tabla 6.2** Concentraciones (ng/g) de esteroides y ácidos biliar en las muestras de heces actuales de los diferentes animales (CA-cabras; CAB-caballos; OV-ovejas; VA-vacas; BIS- Bisonte; JAB-jabali y CIER-ciervo). IZ-Izki, LA-Laguardia, AG-Aguillo, HB-Hispano-Breton, PR-Przewalski, TP-Tarpán, AT-Atapuerca, Na-Narbjaja, OP-Opakoa. Caracterización de las muestras aplicando las Eq 3.1, 3.2 y 3.3. En color naranja resultados que no concuerdan con la bibliografía.

Especie y lugar	Cheno	Deox	Lit	EpiCop	Cop	Col	Stigتانول	Cop+EpiCop/Stigتانول Eq 3.1 <1 Rumiante; >1 Omn	(Cop/(Cop+Stigتانول)X100 Eq 3.2 <29% Herbívoro 29%-porcino<65% (urso) Omnívoro<65%	Deox/Lit Eq 3.3 Herb.>10 Omni<0.1	Col/Cop	Deox/ cheno	Lit/Cheno
CA/IZ1	885	55026	1034	10679	26782	11957	148645	0,25(Rumi.)	15(Herb.)	53,24(Herb.)	0,45	62,18	1,17
CA/IZ2	1039	53075	1128	10778	25702	10506	148084	0,25(Rumi.)	15(Herb.)	47,06(Herb.)	0,41	51,08	1,09
CA/IZ3	1193	56976	1222	9801	26242	10056	156300	0,23(Rumi.)	14(Herb.)	46,62(Herb.)	0,38	47,76	1,02
CA/LA1	796	73374	5249	27728	177871	73700	1129008	0,18(Rumi.)	14(Herb.)	13,98(Herb.)	0,41	92,18	6,59
CA/LA2	746	79746	4491	27966	156195	71465	970651	0,19(Rumi.)	14(Herb.)	17,76(Herb.)	0,46	106,9	6,02
CA/LA3	840	65001	4836	27847	167033	69229	1049830	0,19(Rumi.)	14(Herb.)	13,44(Herb.)	0,41	77,38	5,76
CA/AG1	2244	51858	1055	54679	172719	73870	758621	0,3(Rumi.)	19(Herb.)	49,17(Herb.)	0,43	23,11	0,47
CA/AG2	2487	55523	1022	55940	182182	68378	651726	0,37(Rumi.)	22(Herb.)	54,34(Herb.)	0,38	22,33	0,41
CA/AG3	2390	53182	1088	55547	179921	71124	735174	0,32(Rumi.)	20(Herb.)	48,9(Herb.)	0,4	22,25	0,46
CAB/PR1	538952	8245	5918	104276	54415	22504	92802	1,71(No Rumi.)	37(Omn)	1,39	0,41	0,02	0,01
CAB/PR2	656615	7747	5848	106404	55523	22608	91164	1,78(No Rumi.)	38(Omn)	1,32	0,41	0,01	0,01
CAB/PR3	598975	8096	5923	109824	54525	22599	91289	1,8(No Rumi.)	37(Omn)	1,37	0,41	0,01	0,01
CAB/TP1	140055	17117	9447	97741	57206	32113	144710	1,07(No Rumi.)	28(Herb.)	1,81	0,56	0,12	0,07
CAB/TP2	138157	15694	8718	83916	49206	26722	151579	0,88(Rumi.)	25(Herb.)	1,8	0,54	0,11	0,06



Tabla 6.2 (Continuación)

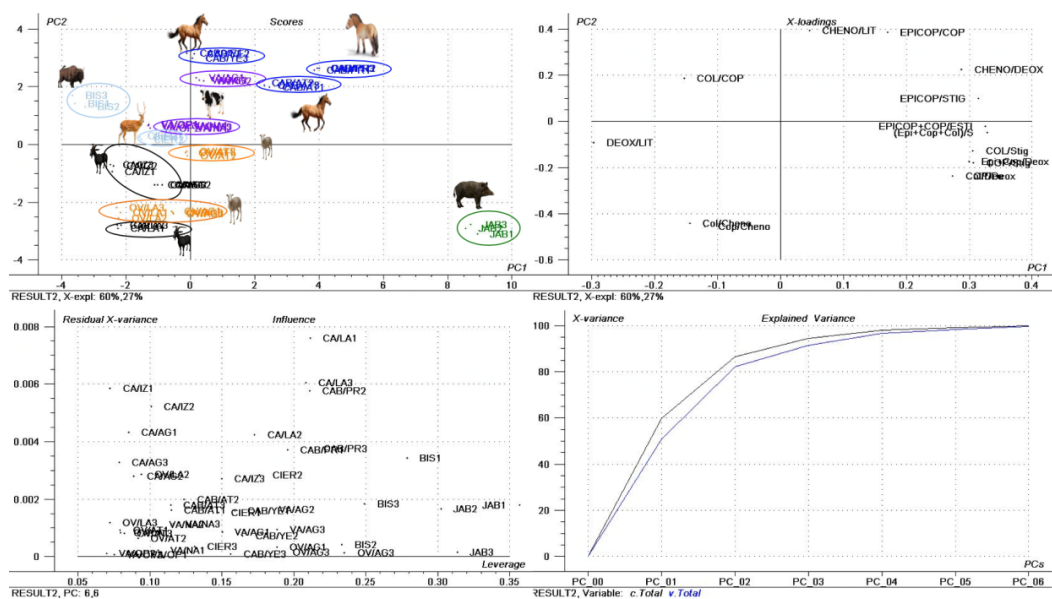
Especie y lugar	Cheno	Deox	Lit	EpiCop	Cop	Col	Stigdanol	Cop+EpiCop/Stigdanol eq 3.1 <1 Rumiante; >1 Omn	(Cop/(Cop+Stigdanol)X100 Eq 3.2 <29% Herbivoro 29%->porcino-<65% (urso) Omnívoro-<65%	Deox/Lit Eq 3.3 Herb.>10 Omn1<0.1	Col/Cop.	Deox/cheno	Lit/Cheno
CAB/TP3	139106	16406	9082	90829	53206	29417	148144	0,97(Rumi.)	26(Herb.)	1,81	0,55	0,12	0,07
CAB/HB1	142955	89278	25802	19834	11242	7053	57857	0,54(Rumi.)	16(Herb.)	3,46	0,63	0,62	0,18
CAB/HB2	167803	82103	25531	21755	12199	6683	57476	0,59(Rumi.)	18(Herb.)	3,22	0,55	0,49	0,15
CAB/HB3	155379	85733	22759	20019	12898	6868	57338	0,57(Rumi.)	18(Herb.)	3,77	0,53	0,55	0,15
OV/LA1	548	35417	1044	12348	56137	28039	256492	0,27(Rumi.)	18(Herb.)	33,93(Herb.)	0,5	64,63	1,91
OV/LA2	493	43606	1096	11515	57559	28327	233387	0,3(Rumi.)	20(Herb.)	39,78(Herb.)	0,49	88,45	2,22
OV/LA3	592	43861	1070	11931	53064	24317	244747	0,27(Rumi.)	18(Herb.)	40,99(Herb.)	0,46	74,09	1,81
OV/AT1	11356	93939	2779	86642	199376	63794	619348	0,46(Rumi.)	24(Herb.)	33,8(Herb.)	0,32	8,27	0,24
OV/AT2	10585	91358	2986	82250	199666	59815	574771	0,49(Rumi.)	26(Herb.)	30,59(Herb.)	0,3	8,63	0,28
OV/AT3	11971	92871	2892	85446	195521	61904	599256	0,47(Rumi.)	25(Herb.)	32,11(Herb.)	0,32	7,76	0,24
OV/AG1	1567	40525	1619	47637	219753	133775	636382	0,42(Rumi.)	26(Herb.)	25,03(Herb.)	0,61	25,86	1,03
OV/AG2	1418	39228	1389	53964	233815	139768	651576	0,44(Rumi.)	26(Herb.)	28,24(Herb.)	0,6	27,66	0,98
OV/AG3	1493	41821	1504	50801	226784	127594	621188	0,45(Rumi.)	27(Herb.)	27,8(Herb.)	0,56	28,01	1,01
VA/NA1	10558	49436	3133	20356	36129	19142	114672	0,49(Rumi.)	24(Herb.)	15,78(Herb.)	0,53	4,68	0,3
VA/NA2	11611	42795	3452	20166	38595	18953	119173	0,49(Rumi.)	24(Herb.)	12,4(Herb.)	0,49	3,69	0,3
VA/NA3	12665	46116	3015	21057	41061	19772	123674	0,5(Rumi.)	25(Herb.)	15,3(Herb.)	0,48	3,64	0,24

Tabla 6.2 (Continuación)

Especie y lugar	Cheno	Deox	Lit	EpiCop	Cop	Col	Stigتانول	Cop+EpiCop/Stigتانول Eq 3.1 <1 Rumiante.; >1 Omn	(Cop/(Cop+Stigتانول)X100 Eq 3.2 <29% Herbívoro 29%-porcino-<65% (urso) Omnívoro-<65%	Deox/Lit Eq 3.3 Herb.>10 Omn.<0.1	Col/Cop.	Deox/Cheno	Lit/Cheno
VA/AG1	111108	59258	19646	24021	23822	20221	103892	0,46(Rumi.)	19(Herb.)	3,02	0,85	0,53	0,18
VA/AG2	114774	62724	20565	26115	26778	22233	100547	0,53(Rumi.)	21(Herb.)	3,05	0,83	0,55	0,18
VA/AG3	99442	60991	20106	23927	24189	21227	97201	0,5(Rumi.)	20(Herb.)	3,03	0,88	0,61	0,2
VA/OP1	12677	39904	1128	22189	63269	42433	390258	0,22(Rumi.)	14(Herb.)	35,37(Herb.)	0,67	3,15	0,09
VA/OP2	11600	37861	1330	22523	63869	42306	397118	0,22(Rumi.)	14(Herb.)	28,46(Herb.)	0,66	3,26	0,11
VA/OP3	12138	41948	1246	23330	63569	42370	403978	0,22(Rumi.)	14(Herb.)	33,66(Herb.)	0,67	3,46	0,1
BIS1	1758	5579	489	1640	3874	6485	62417	0,09(Rumi.)	6(Herb.)	11,4(Herb.)	1,67	3,17	0,28
BIS2	2070	4884	451	1729	4503	6056	64141	0,1(Rumi.)	7(Herb.)	10,83(Herb.)	1,34	2,36	0,22
BIS3	2381	6275	413	1552	3878	6340	61839	0,09(Rumi.)	6(Herb.)	15,21(Herb.)	1,63	2,64	0,17
CIER1	4954	10874	490	8446	33465	25410	222840	0,19(Rumi.)	13(Herb.)	22,2(Herb.)	0,76	2,19	0,1
CIER2	5433	13795	543	9131	39047	24917	234574	0,21(Rumi.)	14(Herb.)	25,42(Herb.)	0,64	2,54	0,1
CIER3	4476	12335	474	8788	32281	24424	228707	0,18(Rumi.)	12(Herb.)	26(Herb.)	0,76	2,76	0,11
JABI	49608	1183	88903	350113	899647	231256	154397	8,09(Omn)	85(Omn)pero no porcino	0,01(Omn)	0,26	0,02	1,79
JAB2	41993	1363	72359	342641	755861	197648	145850	7,53(Omn)	84(Omn)pero no porcino	0,02(Omn)	0,26	0,03	1,72
JAB3	57222	1553	72670	346377	827754	214452	137302	8,55(Omn)	86(Omn)pero no porcino	0,02(Omn)	0,26	0,03	1,27

Como se puede observar en la Tabla 6.2, la mayoría de los resultados obtenidos concuerdan con la bibliografía a excepción de los caballos (Hispano-Bretón, Przewalski y Tarpán), las vacas de Aguillo y los Jabalís. En el caso de los Przewalski, las Ec. 3.2 y 3.4 los clasifican como omnívoros o no herbívoro cuando evidentemente son herbívoros. En el caso de la Ec 3.3, todos los caballos tienen mayor cantidad de Deox que de Lit pero en mucha menor abundancia que el resto (menor al 10%) lo que no puede asegurar que sean residuos de herbívoros cuando realmente lo son, al igual que las vacas de Aguillo. Además, la ec. 3.1 clasifica a los Tarpanes y a los Hispano-Bretones como rumiantes cuando no lo son. Esta diferencia puede deberse a que los caballos no son herbívoros rumiantes como el resto. En el caso del Jabalí, la Ec. 3.2 lo cataloga como omnívoro, pero no como porcino ya que su porcentaje es mayor al 69% y además no se detecta Urso.

Por todo ello, se procedió a clasificar las heces utilizando herramientas quimiométricas como la clasificación SIMCA. En primer lugar, se procedió a realizar un análisis del componente principal (PCA) de las heces actuales (Figura 6.3). Para este análisis, y teniendo en cuenta la necesidad de comparar relaciones entre analitos y no concentraciones brutas, se utilizaron relaciones entre las concentraciones logarítmicas de los diferentes esteroides y ácidos biliares normalizados (Deox/Lit; Cheno/Lit; Col/Cop; EpiCop/Cop; Cheno/deox, Epicop+Cop/Stigتانول; EpiCop+Cop+Col/Stigتانول; Col/Stigتانول; Cop/Deox; EpiCop/Cheno y Stigتانول/Deox). El PC2 vs PC1 describe el 87% de las muestras.

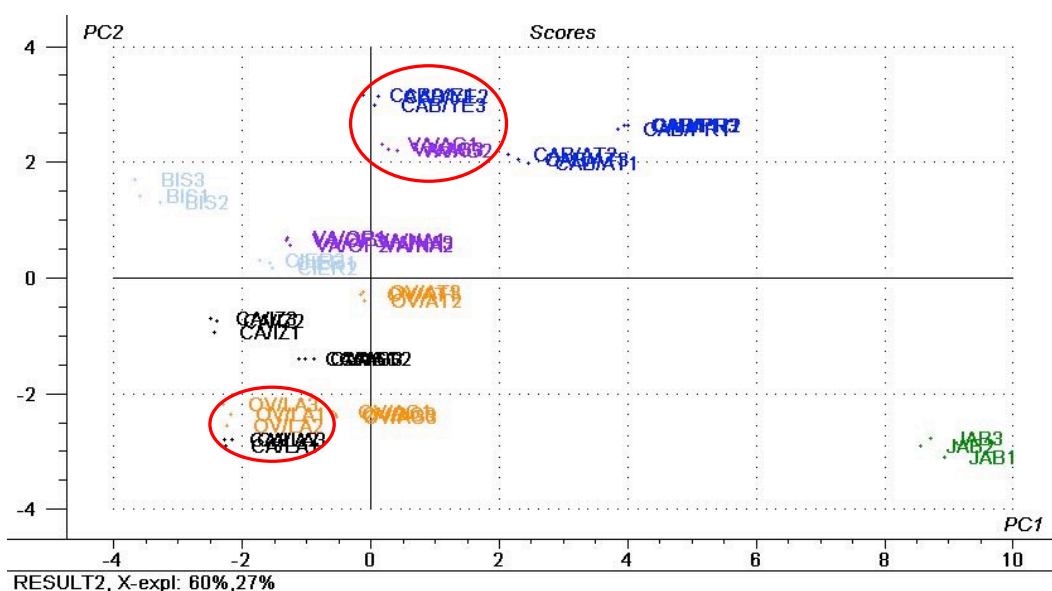


**Figura 6.3** Análisis del componente principal (PCA) de los diferentes restos de heces de herbívoros actuales y relaciones de los logaritmos de las concentraciones de las variables normalizadas.

Tal como se observa en la Figura 6.3, se aprecian dos grandes agrupaciones, una correspondiente a los herbívoros y otra al jabalí. En el caso de la agrupación de herbívoros se puede intuir una separación en función de su tamaño, ya que los más grandes se encuentran en la parte superior influenciados por la parte positiva del PC2, mientras que los más pequeños se ven influenciados por la parte negativa del PC2 en la parte inferior. Otras dos agrupaciones que se pueden intuir son la de herbívoros rumiante (Bisonte, Cabra, Oveja, Vaca y Ciervo) y no rumiante (Caballo), aunque esta última no es muy clara.

También se puede observar como no hay agrupación entre especie, y sobre todo en el caso de las cabras y las ovejas. Dentro de las cabras se forman dos grupos: por un lado las cabras de Izki y Aguillo y por otro las cabras de Laguardia. Similar es el caso de las ovejas donde se forman dos grupos: las ovejas (Laguardia y Aguillo), y las ovejas de Atapuerca. Es evidente que las relaciones entre los esteroides y los ácidos biliares no consiguen clasificar los grupos por especie, ya que independientemente del lugar de pasto

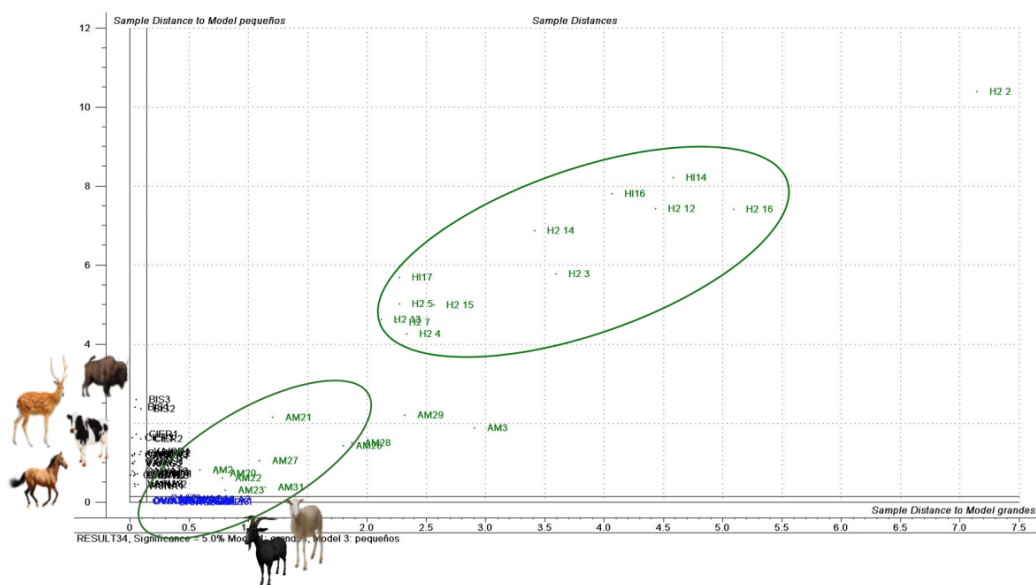
y alimentación, no se separarán y si se realiza una clasificación SIMCA con heces actuales no es capaz de clasificarlas por especie (datos no mostrados). Además, en este caso, claramente, las ovejas y cabras, y los caballos y vacas que pastan juntos se agrupan (Figura 6.4). Esto puede dar una idea, que independientemente de la alimentación, ya que, aunque pasten juntos no comen igual, estas relaciones no son capaces de separarlas.



**Figura 6.4.** Agrupaciones de especies diferentes que pastan juntas. Agrupadas, por un lado, las ovejas y cabra, y por otro, los caballos y vacas que pastan juntas.

Con el objeto de poder hacer una clasificación de las muestras arqueológicas utilizando los modelos generados con los PCA, se hizo uso de la herramienta SIMCA, que mediante un modelo de reconocimiento de patrones basado en el principio de analogía entre las muestras que pertenecen a la misma clase, se enfrentó a las muestras arqueológicas de Los Husos I, II y El Mirador. Las categorías principales conocidas se clasificaron en tres grupos; por un lado los animales de mediano tamaño (cabras y ovejas), por otro las de mayor tamaño (vacas, caballos, ciervos y bisontes) y por último el jabalí.

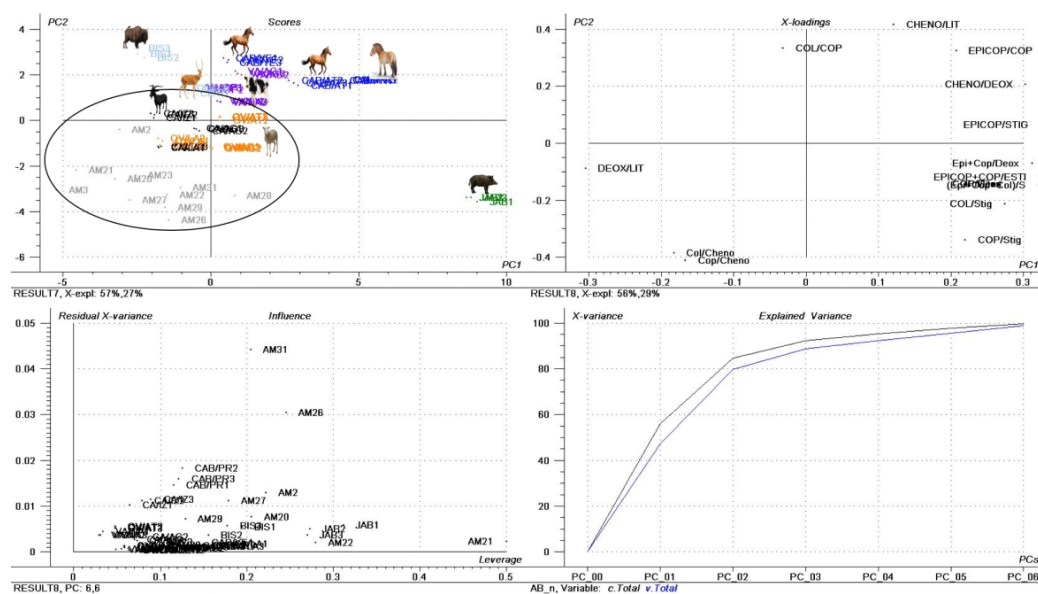
Tal como se observa al realizar la confrontación de los animales de mediano tamaño (cabras y ovejas) con los de mayor tamaño (vacas, caballos, ciervos y bisontes), con todas las muestras arqueológicas en su conjunto (El Mirador, Los Husos II y II) (Figura 6.5), ninguna de las muestras llegan a ser clasificada. Sin embargo, si que se aprecia que las muestras de la cueva de El Mirador AM2, AM20, AM22, AM23, AM27, AM21 y AM31 son las que se encuentran más próximas a las cabras y ovejas, mientras que por el contrario, las muestras de Los Husos I y II se encuentran muy alejadas del modelo.



**Figura 6.5.** Modelos de reconocimiento de patrones mediante el uso de la herramienta SIMCA "Soft Independent Modelling by Class Analogy" y enfrentamiento de las diferentes categorías clasificadas de animales grandes (vacas, caballos, ciervos y bisontes) frente a animales medianos (cabras y ovejas) todas ellas con un 10% de significancia, con el objeto de clasificar muestras arqueológicas de los Husos I,II y de la cueva de El Mirador.

Debido a la imposibilidad de clasificar las muestras arqueológicas mediante SIMCA, se decidió realizar un PCA con todas las muestras separadas por yacimientos y observar si se podrían clasificar las muestras por cercanía.

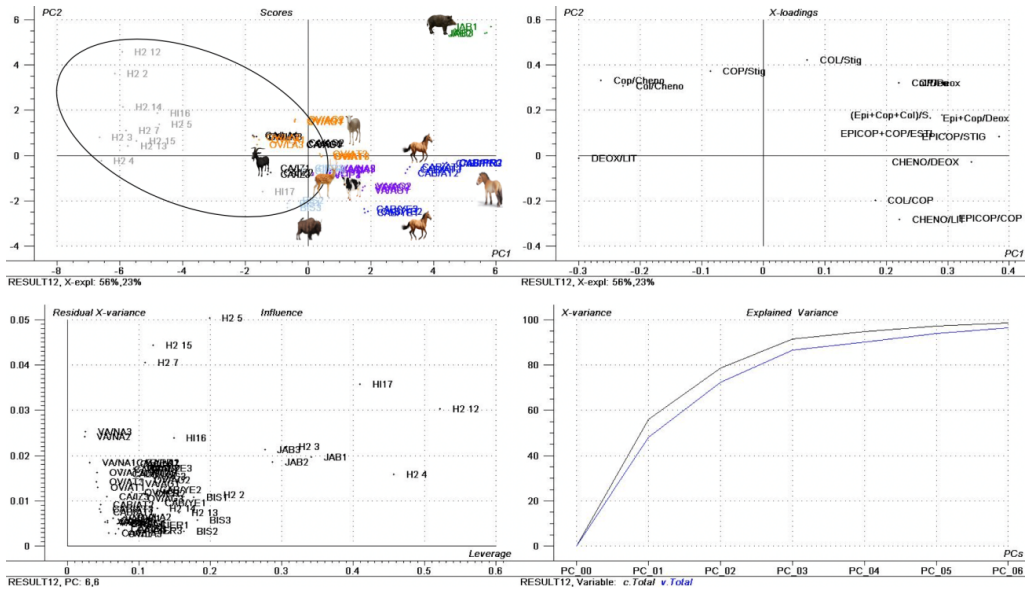
Al introducir las muestras arqueológicas de la cueva de El Mirador en el modelo (Figura 6.6), se observa que igual que con el resto de animales pequeños (ovejas y cabras), las muestras arqueológicas están influenciadas por el PC2 y PC1 en su vertiente negativa, concretamente, se sitúan en la parte inferior, siendo la muestra AM2 la que mayor aproximación presenta. De este modo, parece ser, que las muestras de El Mirador podrían tener origen ovicaprino.



**Figura 6.6** Análisis del componente principal (PCA) de las diferentes muestras arqueológicas de la cueva de El Mirador y retos de heces de herbívoros actuales y el logaritmo de las concentraciones de las variables normalizadas de los de los ratios de esteroides y ácidos biliares.

Al introducir en el modelo las muestras arqueológicas de Los Husos I y II (Figura 6.7) se observa que están situadas preferentemente en la parte superior izquierda, teniendo una influencia importante el PC1 negativo y PC2 positivo. Los animales más próximos son como en el caso anterior las cabras y ovejas, sin embargo se encuentran muy alejadas de los ovicaprinos. La muestra HI 17 destaca sobre el resto de las muestras arqueológica por su proximidad a las muestras actuales, encontrándose próxima a las cabras y bisonte.





**Figura 6.7.** Análisis del componente principal (PCA) de las diferentes muestras arqueológicas de Los Husos I, II y retos de heces de herbívoros actuales y el logaritmo de las concentraciones de las variables normalizadas de los de ratios de esteroides y ácidos biliares.

Al no clasificar de forma clara las muestras arqueológicas, se intentó trabajar con nuestras propias ecuaciones y clasificaciones, usando las relaciones obtenidas en las heces actuales (Tabla 6.3 y Tabla 6.4)



Tabla 6.3. Resultados obtenidos para las relaciones propuestas

Especie	Herbívoros		Deox/ Lit	Deox/ Cheno	Lit/ Cheno	EPICOP/ Cop	COL/ COP
	(COP/(COP+Estigtano))x100 (%)	COP+EpiCOP/ Estigtanol					
Cabra	<40%	≤1	13	22	0,4	0,16	0,38
			54	107	6,6	0,42	0,46
Caballo	<40%	≤2	1	0,01	0,009	1,6	0,41
			4	0,62	0,180	2,0	0,63
Oveja	<40%	≤1	25	7,8	0,2	0,2	0,30
			41	88,4	2,2	0,4	0,61
Vaca	<40%	≤1	3	0,5	0,09	0,35	0,48
			35	4,7	0,30	1,0	0,88
Bisonte	<40%	≤1	11	2,4	0,17	0,38	1,34
			15	3,2	0,28	0,42	1,67
Ciervo	<40%	≤1	22	2,2	0,099	0,23	0,64
			26	2,8	0,106	0,27	0,76
Jabali	>80%	>8	0,013	0,024	1,3	0,39	0,26
			0,021	0,032	1,8	0,45	0,26

Tabla 6.3.(Continuación)

Especie		COP/ Stigfanol	EPICOP/ Stigfanol	Epi+Cop/ Deox	COP/ Deox	Col/ Deo	Cop/ Cheno	Col/ Cheno	(Epi+Cop+Col)/ Stigfanol	Col/ Stigfanol
<b>Cabra</b>	Min	0,16	0,02	0,63	0,46	0,18	22	8,4	0,25	0,06
	Max	0,28	0,09	4,4	3,38	1,4	223	95,9	0,47	0,10
<b>Caballo</b>	Min	0,19	0,34	0,35	0,13	0,08	0,07	0,03	0,66	0,12
	Max	0,61	1,20	20,9	7,17	2,9	0,41	0,23	2	0,25
<b>Oveja</b>	Min	0,22	0,05	1,48	1,21	0,5	16	5,2	0,36	0,10
	Max	0,37	0,14	7,34	5,96	3,6	165	98,6	0,66	0,21
<b>Vaca</b>	Min	0,16	0,06	0,79	0,40	0,3	0,21	0,18	0,32	0,10
	Max	0,33	0,26	2,28	1,69	1,1	5,5	3,65	0,75	0,22
<b>Bisonte</b>	Min	0,06	0,03	0,87	0,62	1,0	1,6	2,66	0,19	0,09
	Max	0,07	0,03	1,28	0,92	1,2	2,2	3,7	0,19	0,10
<b>Ciervo</b>	Min	0,14	0,04	3,33	2,62	1,8	6,8	4,6	0,29	0,11
	Max	0,17	0,04	3,85	3,08	2,3	7,2	5,46	0,31	0,11
<b>Jabalí</b>	Min	5,18	2,27	756	533	138	14,5	3,75	8,89	1,36
	Max	6,03	2,52	1056	760	195	18,1	4,71	10,11	1,56

**Tabla 6.4** Relaciones y caracterización de las muestras arqueológicas de la cueva de El Mirador (Atapuerca, Burgos) y Los Husos I y II (Municipio de EL Villar, Rioja Alavesa)

Muestras	Cop/(Cop+Stigianol) (%)	Cop+EpiCop /Stigianol	Deox/Lit	Deox/Cheno	Lit/Cheno	EpiCop/Cop
AM3	17(Herb.)	0,24(Herb.)	46(CA)(Herb)	210(??)	4,5(CA)	0,209(CA)
AM21	38(Herb.)	0,65(Herb.)	32(CA-OV-VA)(Herb)	127(??)	4,0(CA)	0,043(??)
AM22	56(??)	1,48(Herb. Cab)	41(CA)(Herb)	165(??)	4,0(CA)	0,166(CA)
AM1	20(Herb.)	0,28(Herb.)	No Lit(??)(Herb)	88(??)	No Lit(??)	0,156(CA)
AM2	27(Herb.)	0,46(Herb.)	43(CA)(Herb)	70(??)	1,6(OV-CA-JAB)	0,269(CA-OV-Cier)
AM23	38(Herb.)	0,69(Herb.)	21(CA-VA)(Herb)	109(??)	5,2(CA)	0,124(??)
AM26	53(Omn)	1,33(Herb. Cab)	24(CA-CI-VA)(Herb)	132(??)	5,5(CA)	0,164(CA)
AM27	43(Omn)	0,89(Herb.)	31(CA-OV-VA)(Herb)	131(??)	4,2(CA)	0,163(CA)
AM20	47(Omn)	0,97(Herb.)	64(??)(Herb)	242(??)	3,8(CA)	0,094(??)
AM28	51(Omn)	1,23(Herb. Cab)	57(CA)(Herb)	629(??)	11,1(??)	0,164(CA)
AM29	45(Omn)	0,92(Herb.)	47(CA)(Herb)	338(??)	7,3(??)	0,104(??)
AM31	47(Omn)	1,06(Herb. Cab)	28(CA-OV-VA)(Herb)	334(??)	12,0(??)	0,205(CA-OV)
HI14	66(Omn)	1,9(Herb. Cab)	No Lit(??)(Herb)	(??)	(??)	(??)
HI16	66(Omn)	1,96(Herb. Cab)	No Lit(??)(Herb)	(??)	(??)	(??)
HI17	68(Omn)	2,09(??)	27(CA-OV-VA)(Herb)	1,3(VA)	0,05	(??)
HI2	100(Omn)	no Stigianol	81(Herb)	(??)	(??)	(??)
HI3	45(Omn)	0,83(Herb.)	85(Herb)	(??)	(??)	(??)
HI4	60(Omn)	1,52(Herb. Cab)	117(Herb)	719(??)	6,1(CA)	(??)
HI5	80(Jab)	3,95(Omn)	132(Herb)	376(??)	2,9(CA)	(??)
HI7	71(Omn)	2,45(Omn)	121(Herb)	676(??)	5,6(CA)	(??)
HI12	83(Jab)	4,87(Omn)	247(Herb)	(??)	(??)	(??)
HI13	70(Omn)	2,35(Omn)	250(Herb)	549(??)	2,2(CA)	(??)
HI14	71(Omn)	2,44(Omn)	74(Herb)	(??)	(??)	(??)
HI15	50(Omn)	1,01(Herb. Cab)	No Lit(??)(Herb)	104(??)	(??)	(??)
HI16	62(Omn)	1,61(Herb Cab)	No Lit(??)(Herb)	21(OV-OV/CA)	(??)	(??)

Tabla 6.4. (Continuación)

Muestras	Col/Cop	Cop/ Stigdanol	EpiCop/ Stigdanol	EpiCop+Cop/ Deox	Cop/ Deox	Col/ Deo
AM3	0,76(VA-Cier)	0,20(CA-VA-CAB)	0,042(CA)	0,68(CA-CAB)	0,57(CA-VA-CAB)	0,429(CA-VA-CAB)
AM21	0,41(CA-OV)	0,62CAB(?)	0,027(CA-CIER)	0,16(?)	0,15(CAB)	0,063CAB(?)
AM22	0,42(CA-OV)	1,27(?)	0,210(VA)	0,27(?)	0,24(CAB)	0,098(CAB)
AM1	0,89(?)	0,25(CAB-OV-VA)	0,038(CAB-CIER)	1,37(CA-VA-CAB)	1,19(CA-OV-VA-CAB)	1,060(BI-VA-OV-CAB-CA)
AM2	0,93(?)	0,37(OV-CAB)	0,098(VA)	0,25(?)	0,20(CAB)	0,186(CA-CAB)
AM23	0,49(OV-VA-CAB)	0,61(CAB)	0,076(CAB-OV-VA)	0,48(CA-VA-CAB)	0,43(CAB-VA)	0,213(CA-CAB)
AM26	0,40(CA-OV-CAB)	1,14(?)	0,187(CAB-VA)	0,75(CA-CAB)	0,65(BI-VA-CAB-CA)	0,258(CA-CAB)
AM27	0,26(JAB)	0,76(?)	0,125(CAB-OV-VA)	0,71(CA-CAB)	0,61(BI-VA-CAB-CA)	0,161(CA-CAB)
AM20	0,40(CA-OV-CAB)	0,88(?)	0,083(CA)	0,12(?)	0,11(CAB)	0,042(?)
AM28	0,48(OV-VA-CAB)	1,06(?)	0,173(CAB-VA)	0,13(?)	0,11(CAB)	0,054(?)
AM29	0,40(CA-OV-VA-CAB)	0,83(?)	0,087(CA)	0,11(?)	0,10(CAB)	0,040(?)
AM31	0,26(JAB)	0,88(?)	0,180(CAB-VA)	0,58(CAB)	0,48(CA-VA-CAB)	0,125(CAB)
H14	0,19(?)	1,90(?)	(?)	5,17(OV-CAB)	5,17(OV-CAB)	0,958(BI-VA-OV-CAB-CA)
H16	0,33(OV)	1,96(?)	(?)	0,32(?)	0,32(CAB)	0,107(CAB)
H17	0,31(OV)	2,09(?)	(?)	0,21(?)	0,21(CAB)	0,065(?)
H12	0,16(?)	(?)	(?)	0,51(CAB)	0,51(CA-VA-CAB)	0,083(?)
H13	0,35(OV)	0,83(?)	(?)	0,14(?)	0,14(CAB)	0,049(?)
H14	0,11(?)	1,52(?)	(?)	0,05(?)	0,05(?)	0,006(?)
H15	0,20(?)	3,95(?)	(?)	0,05(?)	0,05(?)	0,009(?)
H17	0,20(?)	2,45(?)	(?)	0,05(?)	0,05(?)	0,010(?)
H12	0,26(JAB)	4,87(?)	(?)	0,15(?)	0,15(CAB)	0,038(?)
H13	0,19(?)	2,35(?)	(?)	0,04(?)	0,04(?)	0,008(?)
H14	0,22(?)	2,44(?)	(?)	0,16(?)	0,16(CAB)	0,036(?)
H15	0,39(CA-OV-CAB)	1,01(?)	(?)	0,27(?)	0,27(CAB)	0,107
H2 16	0(?)	1,61(?)	(?)	3,40(CA-OV-CAB)	3,40(CA-OV-CAB)	(?)

Tabla 6.4. (Continuación)

Muestras	Cop/Cheno	Col/Cheno	(Epi+Cop+Col)/Stiganol	Col/Stiganol
AM3	119(CA)	90,0(CA-OV)	0,40(CA-OV-VA)	0,15(VA-OV-CAB)
AM21	20(CA-OV)	8,0(OV)	0,91(CAB)	0,26CAB(?)
AM22	39(CA-OV)	16,2(CA-OV)	2,00(CAB)	0,53(?)
AM1	105(CA-OV)	93,7(CA-OV)	0,50(OV-VA)	0,22(VA-OV-CAB)
AM2	14(JAB)	13,0(CA-OV)	0,80(CAB)	0,34(?)
AM23	47(CA-OV)	23,2(CA-OV)	0,99(CAB)	0,30(?)
AM26	85(CA-OV)	34,1(CA-OV)	1,79(CAB)	0,46(?)
AM27	80(CA-OV)	21,0(CA-OV)	1,09(CAB)	0,20(VA-OV-CAB)
AM20	26(CA-OV)	10,3(CA-OV)	1,32(CAB)	0,35(?)
AM28	71(CA-OV)	34,1(CA-OV)	1,74(CAB)	0,50(?)
AM29	34(CA-OV)	13,7(CA-OV)	1,25(CAB)	0,34(?)
AM31	160(CA-OV)	41,5(CA-OV)	1,29(CAB)	0,23(VA-CAB)
HII4	(?)	(?)	2,25(?)	0,35(?)
HII6	(?)	(?)	2,60(?)	0,64(?)
HII7	0,29(CAB-VA)	0,1(CAB)	2,74(?)	0,64(?)
HII2	(?)	(?)	(?)	(?)
HII3	(?)	(?)	1,13(CAB)	0,30(?)
HII4	39(CA-OV)	4,2(JAB-CIER)	1,68(CAB)	0,16(VA-OV-CAB)
HII5	17(OV-JAB)	3,4(BIS)	4,74(?)	0,79(?)
HII7	32(CA-OV)	6,6(OV)	2,96(?)	0,50(?)
HII12	(?)	(?)	6,14(?)	1,27(?)
HII13	22(CA-OV)	4,3(JAB)	2,79(?)	0,45(?)
HII14	(?)	(?)	2,99(?)	0,55(?)
HII15	28(CA-OV)	11,2(CA-OV)	1,40(CAB)	0,40(?)
H216	71(CA-OV)	(?)	1,61(CAB)	(?)

Como se puede observar en la Tabla 6.4 dependiendo de la relación utilizada, la clasificación varía considerablemente. Sin embargo, en varias de ellas o las relaciones entre los analitos no se asemejan a las prehistóricas (Deox/Cheno; Cop/Estigtanol; Epicop+Cop/Deox) o la clasificación que realiza (Epicop/Estigtanol; Cop/Deox; Col/Deox; Epicop+Cop+Col/ Estigtanol; Col/ Estigtanol) es contradictoria, comparada con los análisis taxonómicos de los restos óseos y con los de la micromorfología de suelo previos a este estudio. Se realizó un PCA con las variables seleccionadas (Tabla 6.4, color azul y amarillo) y no se obtuvo ninguna nueva conclusión (datos no mostrados)

Al no conseguir clasificar los restos arqueológicos de una forma significativa, mediante las relaciones de esteroides, fitoesteroides y ácidos biliares y en base a estudios previos de comportamiento de pasto de herbívoros<sup>14</sup> se decidió emplear el mismo tratamiento realizado con los esteroides, fitoesteroides y ácidos biliares, con *n*-alcanos.

### **6.3.2. Determinación de la concentración de *n*-alcanos**

En este apartado, se decidió determinar también la concentración de los *n*-alcanos (C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>), ya que estos alcanos lineales están relacionados con la alimentación animal.

#### *6.3.2.1 Reactivos y materiales*

Los patrones de los alcanos C<sub>25-31</sub> así como el disolvente empleados para la extracción de las muestras (*n*-hexano) fueron suministrados por Sigma-Aldrich® (Madrid, España). Se utilizó para este proceso una centrifuga (Unicen, ortoalresa, España), un evaporador analítico de nitrógeno con control de regulación de la temperatura (Techhen®, Sample Concentrator, Staffordshire, ST15 OSA, UK), un agitador mecánico (Selecta®, vibromatic, Abrera, Barcelona) y filtros de PTFE 0,22µm (Olim Peak, Teknocroma, Barcelona).

### *6.3.2.2 Extracción líquido-líquido (LLE)*

5g de muestra arqueológica y 0,1 g de heces actuales se pesaron y se realizó una extracción sólido-líquido asistida por agitación mecánica durante 10 min con 10 mL de *n*-hexano. A continuación, se procedió a su centrifugación a 10.000 r.p.m durante 5 min, recogida del sobrenadante y evaporación total hasta sequedad en corriente de nitrógeno. Finalmente, se procedió a la reconstitución en 2mL de *n*-hexano y filtrado a 0,22 $\mu$ m.

### *6.3.2.3 Instrumentación GC-MS*

Para el análisis se empleó un cromatógrafo de gases (GC) modelo 7890 acoplado a un espectrómetro de masas 5973 (qMS) y una columna HP 5 MS (30m x 0,25mm, 0,25 $\mu$ m) todos ellos suministrados por Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), Se empleó He (pureza: 99,99%) como gas portador, a un flujo constante de 1,7 mL/min. 2  $\mu$ L del extracto es inyectado en modo splitless (2min) a 300 °C. La temperatura del horno del GC presentó el siguiente gradiente: se mantuvo a 60 °C durante un minuto y a continuación se incrementó a razón de 8°C/min hasta los 290°C, manteniéndose esta temperatura final máxima durante 10min.

Se trabajó en modo SCAN *m/z* 50-550 y SIM con fuente de ionización y cuadrupolo con temperaturas de 230 y 150 ° C respectivamente. La *m/z* monitorizada para cada uno de los compuestos fué la siguiente: *n*-alcanos, C<sub>25</sub> iones (352/85), C<sub>27</sub> iones (381/85), C<sub>29</sub> iones (408/85) y C<sub>31</sub> iones (437/85), utilizando el primer ion como cuantificador y el segundo como cualificador.

#### 6.3.2.4 Parámetros de calidad

##### 6.3.2.4.1 Calibración del método

Se realizó un calibrado en matriz dopando tierras blanco en un rango de concentraciones de los analitos entre 15-7,000 ng/g. Conjuntamente, se analizaron tres réplicas de las tierras para asegurar la ausencia de los analitos de interés en la matriz.

El coeficiente de correlación fue mayor al 0,99 en todos los casos.

##### 6.3.2.4.2 Cálculo del límite de detección y límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) y el límite de detención (LOD) se ha calculado mediante la señal obtenida de la extracción de 5g de blanco de muestra. Debido a que se ha observado señal de todos los compuestos en los blancos, tanto la  $S_{LOD}$  como la  $S_{LOQ}$  se ha calculado haciendo uso de la señal y su desviación estándar tal como puede observarse en la ec. 3.6 y ec. 3.7.

$$S_{LOD} = \bar{S} + 3s \quad \text{y} \quad S_{LOQ} = \bar{S} + 10s \quad (\text{ec. 3.6 y ec. 3.7})$$

Una vez calculados las  $S_{LOD}$  y la  $S_{LOQ}$  de cada uno de los analitos, se procedió al cálculo de los límites de concentraciones obteniéndose valores comprendidos entre 7,17 y 110,95 ng/g para el  $C_{LOD}$  y 9,23 y 275,15 ng/g para el  $C_{LOQ}$ .

##### 6.3.2.4.3 Recuperación del método a concentraciones altas y bajas

Otro criterio de calidad importante para evaluar un método analítico es el de comprobar la recuperación de cada uno de los analitos cuando estos se encuentran tanto a concentraciones bajas como altas. Para ello, se ha hecho uso de los  $C_{LOD}$  de cada uno de los analitos, usándose el límite de detección, ( $C_{LOD} \times 2$ ) para las concentraciones bajas y límites de detección ( $C_{LOD} \times 10$ ) para las concentraciones altas.



Para concentraciones altas se ha obtenido recuperaciones aparentes entre 81,6 y 115,9 % y para concentraciones bajas recuperaciones aparentes entre 99,7 y 108,2 % (Tabla 6.5).

**Tabla 6.5** Recuperaciones del método analítico a concentraciones altas, bajas y cálculo de la desviación estándar relativa (DER) todas expresadas en porcentaje.

n-alcános	Rec. bajas (%) (1ppm)	DER(%)	Rec. altas (%) (10ppm)	DER(%)
C <sub>25</sub>	108,2	3,1	94,7	1
C <sub>27</sub>	107,9	2,1	81,6	8,7
C <sub>29</sub>	104,7	3,3	115,9	2,6
C <sub>31</sub>	99,7	1	100,9	0,2

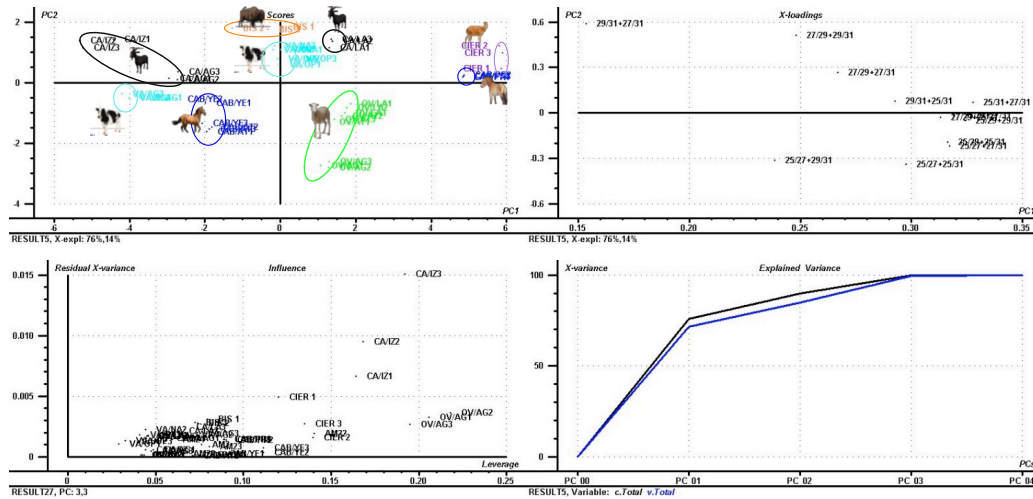
#### 6.4 ANÁLISIS EN MUESTRAS REALES

Se analizaron veinticuatro muestras de carácter sedimentológico (*fumiers*) provenientes de las excavaciones realizadas en rediles prehistóricos localizados en la cueva de El Mirador y los Husos I y II.

Al igual que se realizó, con los esteroides, fitoesteroides y ácidos biliares, para comparar las muestras arqueológicas con las muestras de heces actuales, se realizó un análisis del componente principal (PCA) a todas las muestras de heces actuales a excepción de las de jabalí (Figura 6.10). Para este análisis se utilizaron los ratios de los logaritmos de las concentraciones obtenidas ( $C_{29}/C_{31}+C_{27}/C_{31}$ ;  $C_{27}/C_{29}+C_{29}/C_{31}$ ;  $C_{27}/C_{29}+C_{27}/C_{31}$ ;  $C_{29}/C_{31}+C_{25}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{31}+C_{27}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{27}+C_{29}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{27}+C_{25}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{29}+C_{25}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{27}+C_{27}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{29}+C_{29}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{29}+C_{27}/C_{31}$ ;  $C_{27}/C_{25}+C_{29}/C_{31}$ ). El PC2 vs PC1 describe el 90% de las muestras.

Tal como se observa en la Figura 6.8, se aprecia una agrupación de las heces actuales en función del tipo de herbívoro al que pertenece. También se puede observar como en el caso de las heces de vacas analizadas, se forman dos grupos diferenciados, por un lado,

las heces de vacas de Aguillo y por otro las heces de vaca de Narbaja y Opakua. Lo mismo sucede con las heces de las cabras, por un lado, se agrupan las heces de cabra de Izki y Aguillo y por otro las de Laguardia. Finalmente, se aprecia también la formación de dos agrupaciones entre los caballos Tarpán y Hispano-Bretón, y los Przewalski.



**Figura 6.8** Análisis del componente principal (PCA) de las diferentes muestras de heces de herbívoros actuales y el logaritmo de las concentraciones de las variables normalizadas de los ratios de n-alcános.

Ninguna muestra de los Husos mostraba concentraciones de  $C_{31}$ , con lo que no se pudieron clasificar. Al igual que en la sección 6.3.1., se realizó una clasificación SIMCA para clasificar las muestras arqueológicas de El Mirador, y del mismo modo, no se pudieron clasificar, por lo que se decidió realizar un PCA con todas las muestras, tanto de heces actuales como arqueológicas.

Como se puede observar en la Figura 6.9, las muestras arqueológicas AM23, AM2 y AM24 se agrupan con las heces de oveja y la muestra AM22 se agrupa con las heces de cabra de Aguillo. Sin embargo, la distancia de AM20 con los caballos no es mucho

mayor que a las ovejas por lo que surgen dudas y la AM21 y la AM3 se alejan mucho del modelo.

Por todo ello, y con intención de separar los restos actuales de una forma significativa se decidió realizar una clasificación de heces utilizando tanto los *n*-alcanos como los esteroides, fitoesteroides y ácidos biliares.

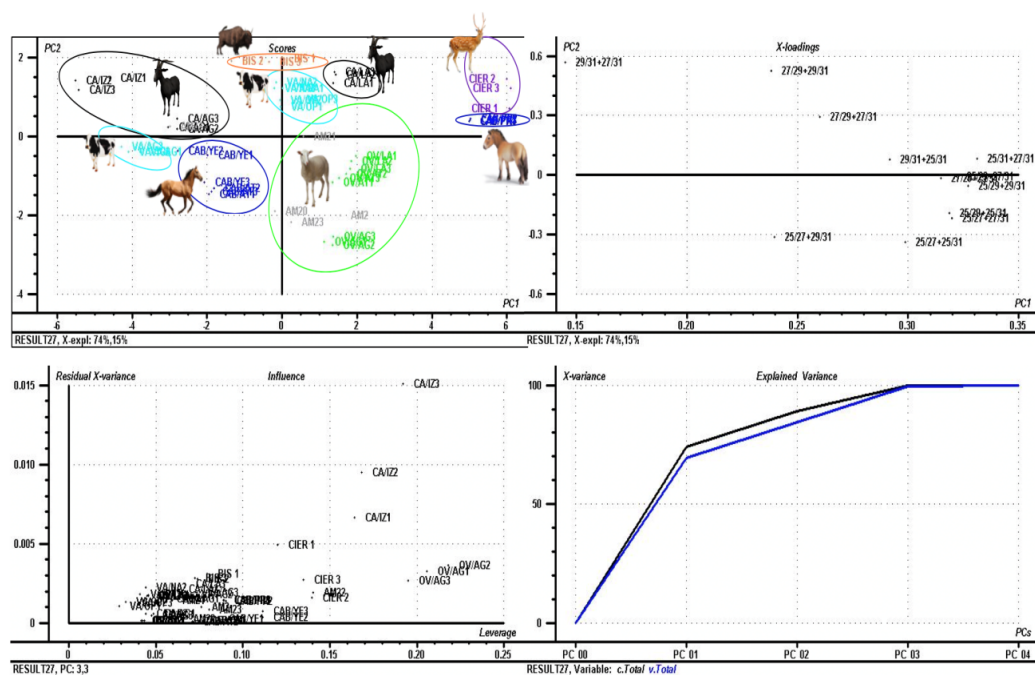


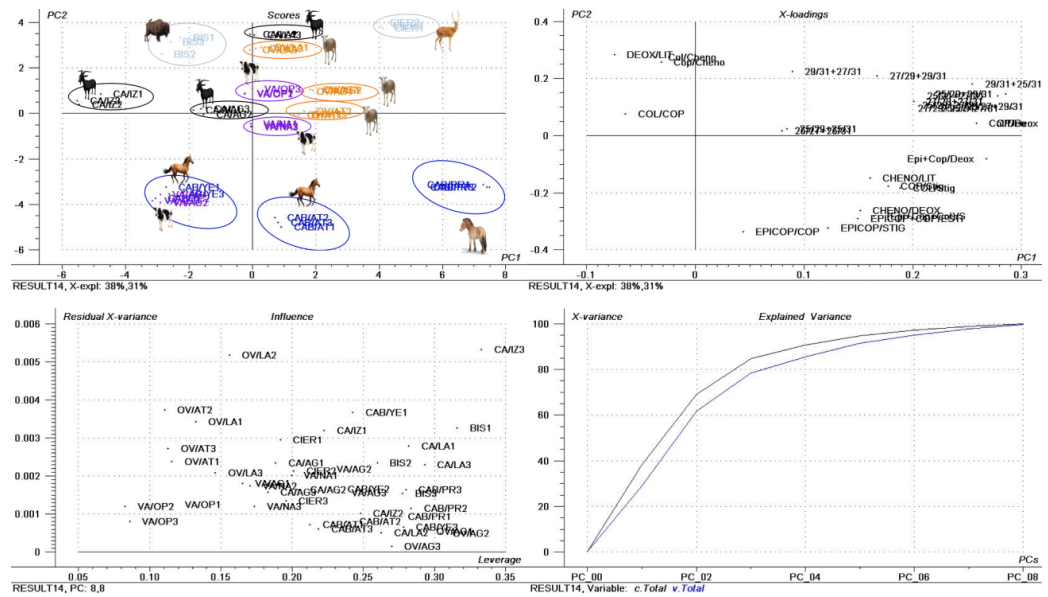
Figura 6.9 Análisis del componente principal (PCA) de las diferentes muestras arqueológicas de El Mirador y retos de heces de herbívoros actuales y el logaritmo de las concentraciones de las variables normalizadas de los ratios de alcanos.

### 6.5 COMBINACIÓN Y SELECCIÓN DE *n*-ALCANOS, ESTEROLES Y ÁCIDOS BILIARES PARA UNA MEJOR CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS ACTUALES Y ARQUEOLÓGICAS.

Con el objeto de mejorar los resultados y poder clasificar las muestras arqueológicas se procedió a unificar los ratios de los *n*-alcanos, esteroides, fitoesteroides y

ácidos biliares. Para ello, se hizo uso de los logarítmicos de todos los ratios normalizados utilizados con anterioridad que a continuación se muestran ( $C_{29}/C_{31}+C_{27}/C_{31}$ ;  $C_{27}/C_{29}+C_{29}/C_{31}$ ;  $C_{27}/C_{29}+C_{27}/C_{31}$ ;  $C_{29}/C_{31}+C_{25}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{31}+C_{27}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{27}+C_{29}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{27}+C_{25}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{29}+C_{25}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{27}+C_{27}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{29}+C_{29}/C_{31}$ ;  $C_{25}/C_{29}+C_{27}/C_{31}$ ;  $C_{27}/C_{25}+C_{29}/C_{31}$ ; Deox/Lit; Cheno/Lit; Col/Cop; EpiCop/Cop; Cheno/deox, Epicop+Cop/Stiganol; EpiCop+Cop+Col/Stiganol; Col/Stiganol; Cop/Deox; EpiCop/Cheno y Stiganol/Deox). El PC2 vs PC1 describe el 69 % de las muestras.

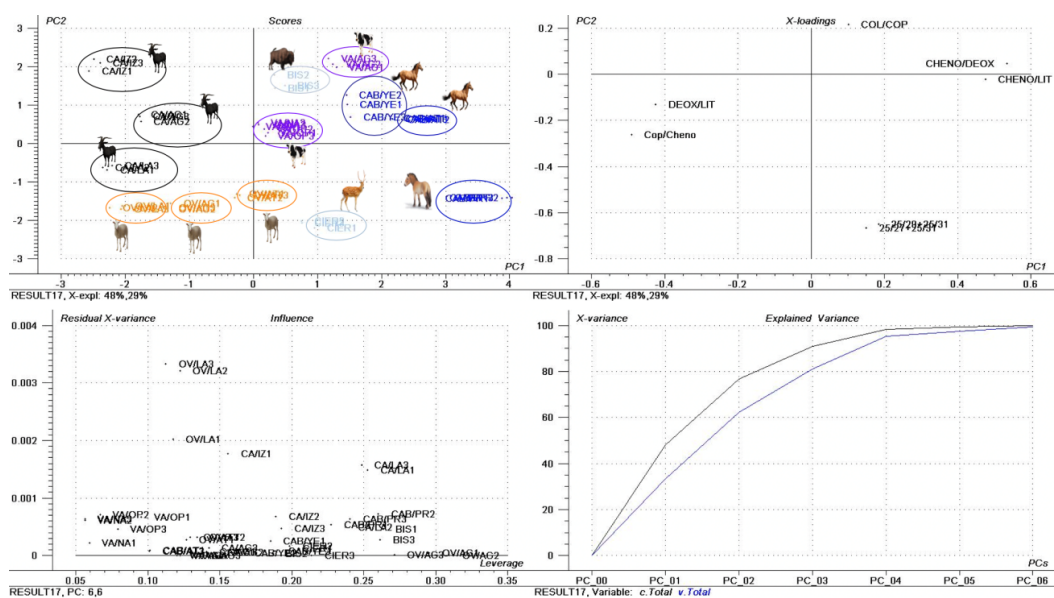
Tal y como se puede observar en la Figura 6.10, al igual que en los casos anteriores, se aprecia una agrupación de las heces frescas en función del herbívoro al que pertenece. Hay una separación en un grupo de los bisontes y ciervos tal como se puede observar en la parte superior de los scores. Así mismo, se apreciar como las cabras, ovejas, vacas y caballos se agrupan en tres bloques cada uno: cabras (Izki, Aguillo y Narbaja), ovejas (Aguillo, Laguardia y Atapuerca), vacas (Opakua, Narbaiz y Aguillo), y los caballos de (Atapuerca, Hispano-Bretón y Przewalski). Podemos constatar que mediante la utilización de todos los biomarcadores, además de conseguir la separación por especie parece posible también la separación de los mismos en función del lugar que pastan. Sin embargo, la separación entre las ovejas y cabras de Laguardia y caballos y vacas de Aguillo no es suficiente para obtener una buena clasificación, por lo que se decidió eliminar variables y utilizar las más significativas.



**Figura 6.10** Análisis del componente principal (PCA) de los diferentes restos de heces de herbívoros actuales y el logaritmo de las concentraciones de las variables normalizadas de los ratios de alcanos, esteroides y ácidos biliares.

Tal y como se observa en la Figura 6.11, utilizando como variables los ratios de Deox/Lit; Cop/Cheno; Col/Cop; Cheno/Deox; Cheno/Lit;  $C_{25}/C_{29}+C_{25}/C_{31}$  y  $C_{25}/C_{27}+C_{25}/C_{31}$  se consiguió una mejor agrupación entre especies y lugar de pasto, a excepción de las vacas de Opakua y Narbaja (PC2 vs PC1 describe el 77 % de las muestras).

Finalmente, también se observan agrupaciones por tamaño de animal, los animales más grandes situados en la parte derecha y los más pequeños en la parte izquierda.

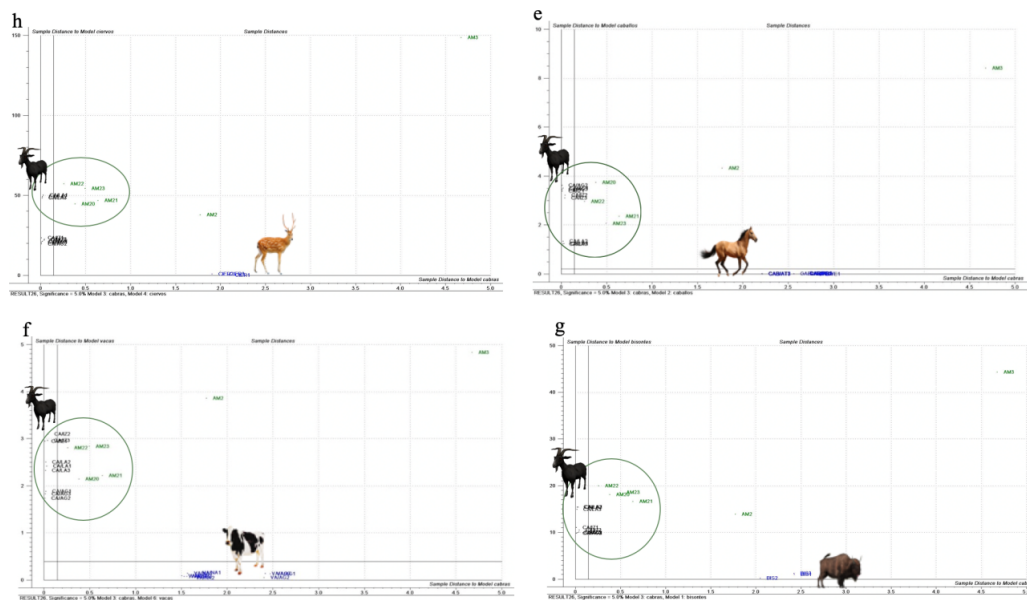


**Figura 6.11** Análisis del componente principal (PCA) de los diferentes restos de heces de herbívoros actuales y el logaritmo de las concentraciones de las variables normalizadas de los ratios de alcanos, esteroles y ácidos biliares seleccionados.

Por otro lado, al igual que se hizo con todos los compuestos, se hizo uso de la herramienta SIMCA sobre los ratios seleccionados y sobre las muestras. Al haber necesidad de utilizar los ratios de las *n*-alcanos, no se pudo clasificar ninguna muestra de los Husos y en caso de El Mirador se clasificaron hasta la muestra AM23 ya que del resto no se dispone resultados de *n*-alcanos. Se enfrentaron las muestras arqueológicas seleccionadas (AM2, AM20, AM21, AM22 y AM23) y las categorías principales conocidas de dos en dos, quedando los enfrentamientos de tal modo: a) caballo frente a vacas; b) cabras frente a ovejas; c) vacas frente a ovejas; d) caballos frente a ovejas; e) cabras frente a caballos; f) cabras frente a vacas; g) cabras frente a bisontes y h) cabras frente a ciervos.

Como se observa en la figura 6.12, en todos los enfrentamientos que confrontaron las cabras con otro animal, aunque no llegan a ser clasificadas por el modelo, se encuentran muy cerca de las cabras. No ocurre lo mismo con las muestras AM2 que se

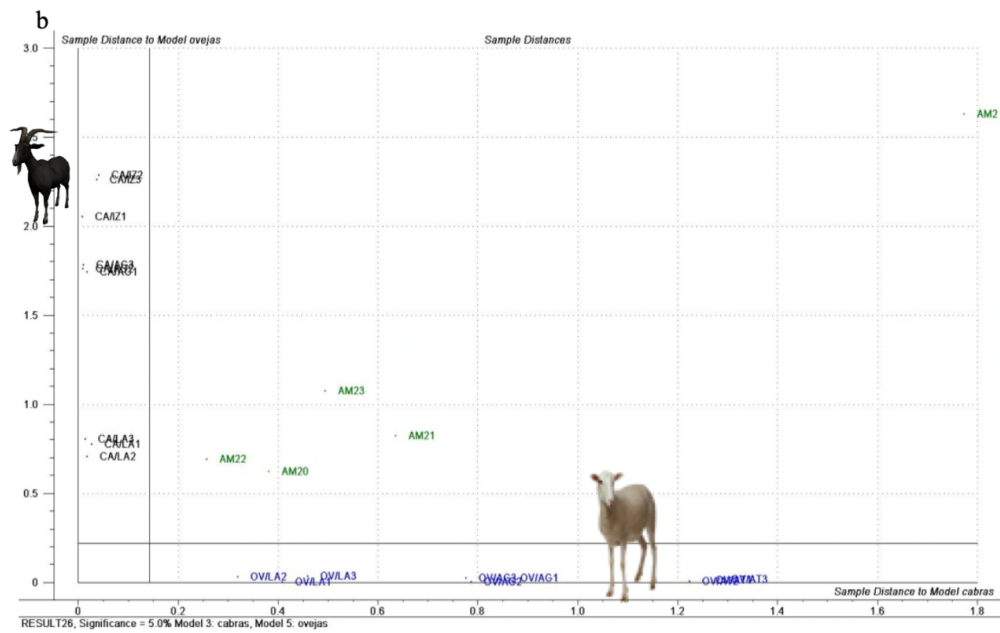
encuentra en una posición intermedia y las muestra AM3 que se encuentra totalmente alejada del modelo. Se observa el mismo comportamiento cuando se confrontan ovejas con otro animal que no sea cabra (Datos no mostrados).



**Figura 6.12** Modelos de reconocimiento de patrones mediante el uso de la herramienta SIMCA y enfrentamiento de las diferentes categorías: h) cabras frente ciervos; e) cabras frente a caballos; f) cabras frente a vacas y g) cabras frente a bisontes todas ellas con un 5% de significancia, con el objeto de clasificar muestras arqueológicas de la cueva de El Mirador.

Si se confrontan cabras frente a ovejas (Figura 6.13), como en los modelos anteriormente mencionados, no existe una clasificación con ninguno de los dos animales, ya que las muestras se sitúan entre las dos.

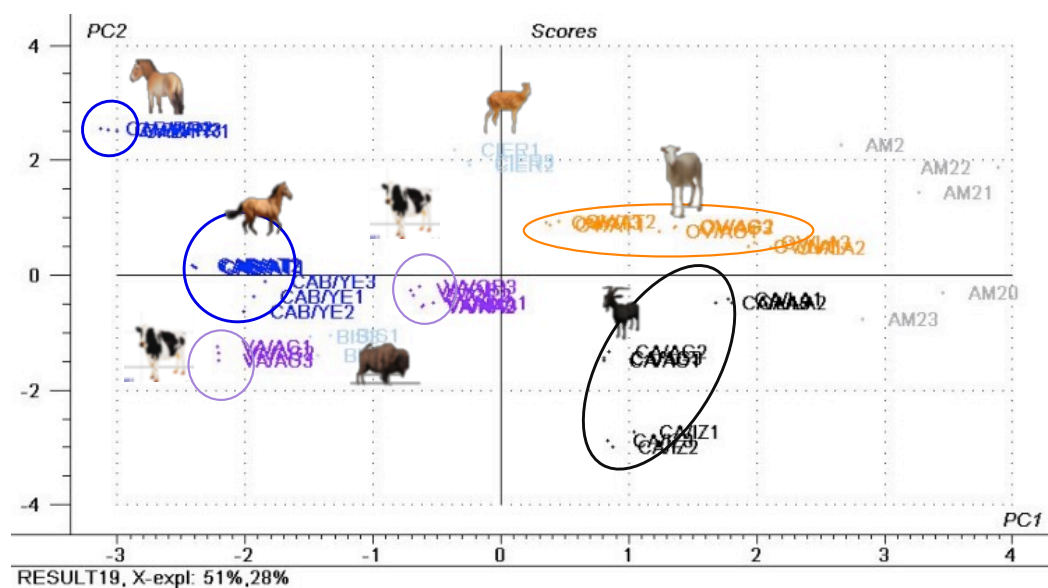




**Figura 6.13** Modelos de reconocimiento de patrones mediante el uso de la herramienta SIMCA y enfrentamiento de las diferentes categorías: b cabras frente a ovejas, todas ellas con un 5% de significancia.

Al no poder clasificar las muestras arqueológicas mediante SIMCA, se incluyeron en el modelo. Como se puede observar en la Figura 6.14, las muestras arqueológicas, se encuentran a la derecha del PCA junto a las ovejas y cabras. AM2, AM22 y AM21 se encuentran más cerca de las ovejas y AM23 y AM20 de las cabras, sin embargo, no se puede afirmar a ciencia cierta que estos restos corresponden a esas heces tal y como se observa en la clasificación SIMCA.





**Figura 6.14** Análisis del componente principal (PCA) de los diferentes restos de heces de herbívoros actuales y muestras de El Mirador y el logaritmo de las concentraciones de las variables normalizadas de los ratios de alcanos, esteroles y ácidos biliares seleccionados.

### 6.6. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

En este apartado final se resumen los resultados obtenidos para las muestras analizadas (Tabla 6.6)

**Tabla 6.6.** Tabla resumen de los resultados obtenidos con los distintos tipos de clasificación realizados. (celdas verde caracterizado como herbívoro)

Muestras	Cop/(Cop+Stigtanol) (%)	Cop+EpiCop/ Stigtanol	Deox/ Lit	Lit/ Cheno
AM3	17(Herb.)	0,24(Herb.)	46(CA)	4,5(CA)
AM21	38 (Herb.)	0,65(Herb.)	32(CA-OV-VA)	4,0(CA)
AM22	56 (??)	1,48(Herb. Cab)	41 (CA)	4,0(CA)
AM2	27(Herb.)	0,46(Herb.)	43(CA)	1,6(OV-CA-JAB)
AM23	38(Herb.)	0,69(Herb.)	21(CA-VA)	5,2(CA)
AM26	53 (Omn)	1,33(Herb. Cab)	24(CA-CI-VA)	5,5(CA)
AM27	43(Omn)	0,89(Herb.)	31(CA-OV-VA)	4,2(CA)
AM20	47(Omn)	0,97(Herb.)	64(??)	3,8(CA)
AM28	51(Omn)	1,23(Herb.Cab)	57(CA)	11,1(??)
AM29	45(Omn)	0,92(Herb.)	47(CA)	7,3(??)
AM31	47(Omn)	1,06(Herb.) Cab	28(CA-OV-VA)	12,0(??)
H114	66(Omn)	1,9(Herb. Cab)	No Lit(??)	(??)
H116	66(Omn)	1,96(Herb. Cab)	No Lit(??)	(??)
H117	68(Omn)	2,09 (??)	27 (CA-OV-VA)	0,05
H2 2	100(Omn)	no Stigtanol	81 (Herb)	(??)
H2 3	45(Omn)	0,83(Herb.)	85 (Herb)	(??)
H2 4	60(Omn))	1,52(Herb. Cab)	117 (Herb)	6,1(CA)
H2 5	80(Jab)	3,95(Omn)	132 (Herb)	2,9(CA)
H2 7	71(Omn)	2,45(Omn)	121 (Herb)	5,6(CA)
H2 12	83 (Jab)	4,87(Omn)	247 (Herb)	(??)
H2 13	70(Omn)	2,35(Omn)	250 (Herb)	2,2(CA)
H2 14	71(Omn)	2,44(Omn)	74 (Herb)	(??)
H2 15	50(Omn)	1,01(Herb. Cab)	No Lit(??)	(??)
H2 16	62(Omn)	1,61(Herb Cab)	No Lit(??)	(??)

**Tabla 6.6.** Tabla resumen de los resultados obtenidos con los distintos tipos de clasificación realizados. (celdas verde caracterizado como herbívoro)

Muestras	EpiCop / Cop	Cop/ Cheno	Col/ Cheno	n-alcenos	Todos SIMCA	Todos
AM3	0,209(CA)	119(CA)	90,0(CA-OV)	(?)	(?)	(?)
AM21	0,043(?)	20(CA-OV)	8,0(OV)	(?)	CA-OV	OV
AM22	0,166(CA)	39(CA-OV)	16,2(CA-OV)	CA	CA-OV	OV
AM2	0,269(CA-OV-Cier)	14(JAB)	13,0(CA-OV)	OV	CA-OV	OV
AM23	0,124(?)	47(CA-OV)	23,2(CA-OV)	OV-CAB	CA-OV	CA
AM26	0,164(CA)	85(CA-OV)	34,1(CA-OV)			
AM27	0,163(CA)	80(CA-OV)	21,0(CA-OV)			
AM20	0,094(?)	26(CA-OV)	10,3(CA-OV)	OV-CAB	CAB-OV	CA
AM28	0,164(CA)	71(CA-OV)	34,1(CA-OV)			
AM29	0,104(?)	34(CA-OV)	13,7(CA-OV)			
AM31	0,205(CA-OV)	160(CA-OV)	41,5(CA-OV)			
H114	(?)	(?)	(?)			
H116	(?)	(?)	(?)			
H117	(?)	0,29(CAB-VA)	0,1(CAB)			
H2 2	(?)	(?)	(?)			
H2 3	(?)	(?)	(?)			
H2 4	(?)	39(CA-OV)	4,2(JAB-CIER)			
H2 5	(?)	17(OV-JAB)	3,4(BIS)			
H2 7	(?)	32(CA-OV)	6,6(OV)			
H2 12	(?)	(?)	(?)			
H2 13	(?)	22(CA-OV)	4,3(JAB)			
H2 14	(?)	(?)	(?)			
H2 15	(?)	28(CA-OV)	11,2(CA-OV)			
H2 16	(?)	71(CA-OV)	(?)			

Como se puede observar en la Tabla 6.6, la interpretación de los resultados varía dependiendo del tipo de clasificación utilizada, aunque la clasificación como herbívoros y ovicaprino parece bastante clara. Aun así, es necesario contrastar estos resultados con los del análisis taxonómico de los restos óseos y con los de la micromorfología de suelos, actualmente en curso, para determinar, cual de todas las clasificaciones es la idónea.

## **6.7. CONCLUSIONES**

Mediante el empleo del análisis multivariante (PCA) además de conseguir agrupar las muestras actuales en función del herbívoro al que pertenecen, dentro de una misma especie de herbívoro, se ha podido agrupar en función del lugar donde frecuentan pastar. En la misma línea, también se ha podido constatar la separación de las especies de herbívoros en función de su tamaño.

Con respecto a las muestras arqueológicas, aunque no han podido ser clasificadas con ninguna especie animal, se ha obtenido modelos donde las muestras arqueológicas se aproximan mucho a las cabras y ovejas.

Las muestras arqueológicas debido al impacto térmico sufrido y su antigüedad, presentan una degradación de los analitos no lineal lo que dificulta su clasificación si se compara con heces actuales.

## **6.8 BIBLIOGRAFIA**

1. Prost, K., Birk, J. J., Lehdorff, E., Gerlach, R. & Amelung, W. Steroid biomarkers revisited - Improved source identification of faecal remains in archaeological soil material. *PLoS ONE* **12**, 1–30 (2017).
2. Harrault, L. *et al.* Faecal biomarkers can distinguish specific mammalian species in modern and past environments. *PLoS ONE* **14**, 1–26 (2019).
3. Leeming, R., Ball, A., Ashbolt, N. & Nichols, P. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Research* **30**, 2893–2900 (1996).
4. Pratt, C., Warnken, J., Leeming, R., Arthur, M. J. & Grice, D. I. Degradation and responses of coprostanol and selected sterol biomarkers in sediments to a simulated major sewage pollution event: A microcosm experiment under sub-tropical estuarine conditions. *Organic Geochemistry* **39**, 353–369 (2008).
5. Canuel, E. A. & Martens, C. S. Reactivity of recently deposited organic matter: Degradation of lipid compounds near the sediment-water interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60**, 1793–1806 (1996).
6. Carrancho, Á. *et al.* Rock-magnetic analyses as a tool to investigate archaeological fired sediments: A case study of mirador cave (Sierra de Atapuerca, Spain). *Geophysical Journal International* **179**, 79–96 (2009).
7. Vergès, J. M. *et al.* La sierra de Atapuerca durante el Holoceno: datos preliminares sobre las ocupaciones de la Edad del Bronce en la Cueva de El Mirador (Ibeas de Juarros, Burgos). *Trabajos de prehistoria* **59**, 107–126 (2002).
8. Vergès, J. M., Allué, E., Angelucci, D. E., Burjachs, F., Carrancho, A., C. & A., Expósito, I., Fontanals, M., Moral, S., Rodríguez, A. and Vaquero, M. 2008. Los niveles neolíticos de la cueva de El Mirador (Sierra de Atapuerca, Burgos): nuevos datos sobre la implantación y el desarrollo de la economía agropecuaria en la submeseta norte. In *Actas del IV Congreso del Neolítico Peninsular* (eds M. S. Hernández, J. (2008).
9. Fernández-Eraso, J. & Polo Díaz, A. Establos en abrigos bajo roca de la Prehistoria Reciente: su formación, caracterización y proceso de estudio. Los casos de Los Husos y de San Cristóbal. *Krei* **10**, 39–51 (2008).

10. Jardé, E., Gruau, G. & Mansuy-Huault, L. Detection of manure-derived organic compounds in rivers draining agricultural areas of intensive manure spreading. *Applied Geochemistry* **22**, 1814–1824 (2007).
11. Wang, Y. H. *et al.* Molecular biomarkers for sources of organic matter in lacustrine sediments in a subtropical lake in China. *Environmental Pollution* **176**, 284–291 (2013).
12. Silliman, J. E., Meyers, P. A. & Bourbonniere, R. A. Record of postglacial organic matter delivery and burial in sediments of Lake Ontario. *Organic Geochemistry* **24**, 463–472 (1996).
13. Tushingham, S., Snyder, C. M., Brownstein, K. J., Damitio, W. J. & Gang, D. R. Biomolecular archaeology reveals ancient origins of indigenous tobacco smoking in North American Plateau [Anthropology]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1–6 (2018). doi:10.1073/pnas.1813796115
14. Oliván, M., Ferreira, L. M. M., García, U., Celaya, R. & Osoro, K. Application of n-alkanes as diet composition markers in grazing/browsing goats and sheep: Effect of using different faecal recovery corrections and plant species grouping approaches. *Australian Journal of Agricultural Research* **58**, 1013–1022 (2007).









---

## Capitulo 7. General conclusions



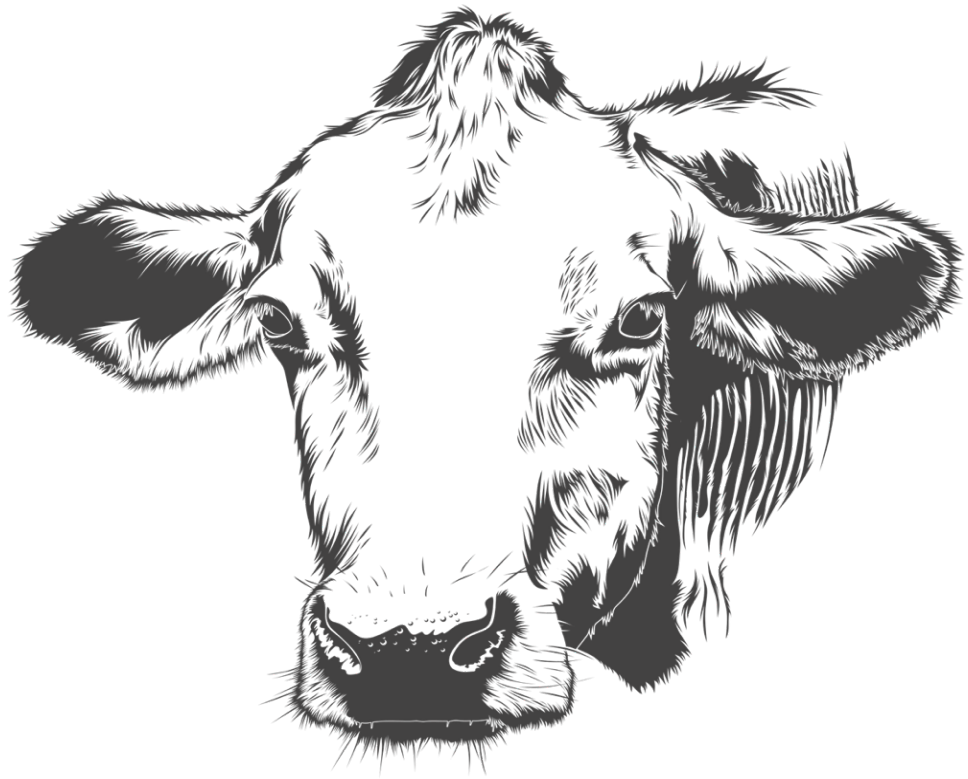
This chapter summarizes the main conclusion obtained from the present research.

- Three analytical methods were optimized and validated for the determination of  $5\beta$ -sterols, bile acids, hormones and *n*-alkanes in order to the characterization of *fumiens* from San Cristobal, Los Husos I, II rock-shelters (Cantabria mountain range, Araba, Spain) and El Mirador cave (Atapuerca mountain range, Burgos, Spain).
- Different extraction strategies (Microwave Assisted Extraction (MAE) and Ultra Sound bath Extraction (USE)) and clean-up techniques (Solid Phase Extraction (SPE)) were used and optimized. High extraction efficiency, robust and reduce extraction time were obtained compared with the literature used to apply in archaeological samples.
- The samples were analysed by GC-MS, Py-GC-MS, EGA-MS and LC-APCI-MS. In general, the highest amount of analytes were detected in the unburned layers lowest burned ones. On the other hands, sterols, phytosterols and bile acids ratios had been able to identify samples as ruminant residues, although, bile acids showed better behavior than sterols and phytosterols in *fumier* structures. Py-GC-MS and EGA-MS analysis were used for lignin residue analysis but the results were not satisfactory and the methodologies should be improved establish valid conclusions
- Focusing in the hormones analysis, PG concentration was present in many of the *facies* studied and the ratio PG/Deox could be related with pregnant females, recently given birth and lambs separation from the herd.
- Chemometrics tools, such as PCA and SIMCA classification have been used in order to classify *facies* by their behavior and biogenic origin using analytes concentration and pyrograms. The behavior of the burnt, partially burnt and unburnt is not always the same, and some partially burnt *facies* behave like unburned ones. Therefore, unburned and partially burned *facies* must be analysed in order to determine the ruminant or not ruminant origin of the *facies*. In the case of the pyrograms, a deeper study of the pyrograms obtained is already necessary.

- In order to determine the biogenic origin of archaeological samples, a SIMCA (*soft independent modeling by class analogy*) classification was proposed. Three different classification models were proposed. One with sterols, phytosterols and bile acids, the second with *n*-alkanes and finally all of them together. Unfortunately, any of them were able to classify unquestionably the archaeological samples neither the ratios proposed. Therefore, these results must be compared with those obtained from sediment's micromorphology analysis.







---

Anexos





**Anexo I. ANALISIS MEDIANTE DRX DE MUESTRAS PROCEDENTES DEL YACIMIENTO ARQUEOLÓGICO DE ATAPUERCA (CUEVA DE EL MIRADOR)**

Muestra	facies	
AM_2	V/VL	SIN COMBUSTIÓN
AM_23	V/VL	
AM_27	V/VL	
AM_28	V/VL	
AM_22	A	
AM_32	A	
AM_10	N	COMBUSTIÓN PARCIAL
AM_7	N	
AM_9	N	
AM_11	N	
AM_26	tf	
AM_25	tf	
AM_16	g	COMBUSTIÓN COMPLETA
AM_1	g	
AM_5	b	
AM_33	b	

## Anexo II. METODOLOGÍA ANALÍTICA

Una porción de cada muestra ha sido molida y homogeneizadas manualmente en un mortero de ágata para su análisis mediante DRX de polvo en un difractor PANalytical Xpert PRO, equipado con tubo de cobre ( $\lambda_{CuK\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$ ,  $\lambda_{CuK\alpha 1} = 1,54060 \text{ \AA}$  y  $\lambda_{CuK\alpha 2} = 1,54439 \text{ \AA}$ ), goniómetro vertical (geometría Bragg-Brentano), rendija programable de divergencia, intercambiador automático de muestras, monocromador secundario de grafito y detector PixCel. Las condiciones de medida han sido 40 KV y 40 mA, con un barrido comprendido entre  $5^\circ$  y  $70^\circ 2\theta$ .

Para el tratamiento informático de los difractogramas obtenidos e identificación de las fases presentes se ha empleado el software específico PANalytical X'pert HighScore, en combinación con la base de datos PDF2 del ICDD.

Se adjuntan los difractogramas experimentales medidos como ficheros XY; que pueden abrirse con EXCEL poniendo en el eje horizontal el ángulo  $2\theta$ , y en el eje vertical la intensidad observada. En cada página se representa el difractograma con escala vertical de tipo "raíz cuadrada", que hace más visibles los picos más pequeños, y también con escala vertical lineal. En estas muestras se identifican los siguientes minerales:

- Cuarzo  $\text{SiO}_2$  romboédrico (Ficha PDF 85-798, en color rojo en las figuras), presente en todas las muestras.
- Calcita  $\text{CaCO}_3$  romboédrico (PDF 5-586, azul), presente en todas las muestras.
- Filosilicatos (minerales de la arcilla), del grupo de las illitas (micas). En las figuras se representa en color verde la ficha PDF 80-742 correspondiente a una moscovita.
- Cantidades menores de apatito  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})$ . En las figuras se representa en color gris la ficha PDF 82-1429 correspondiente a un hidroxiapatito.
- Eventualmente se identifican muy pequeñas cantidades de feldespatos, de tipo potásico (se representa en naranja la ficha PDF 75-1190 de una ortosa  $\text{KAlSi}_3\text{O}_8$ ) y/o de tipo plagioclasas (se representa en rosa la ficha PDF 41-1480 correspondiente a una albita  $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ ).

### Anexo III. RESULTADOS

Se ha procedido a realizar una estimación semicuantitativa según el método de los “poderes reflectantes” de Schultz. Este tipo de estimaciones, aunque útil para comparar entre sí muestras similares (como en este caso), tiene limitaciones, dado que:

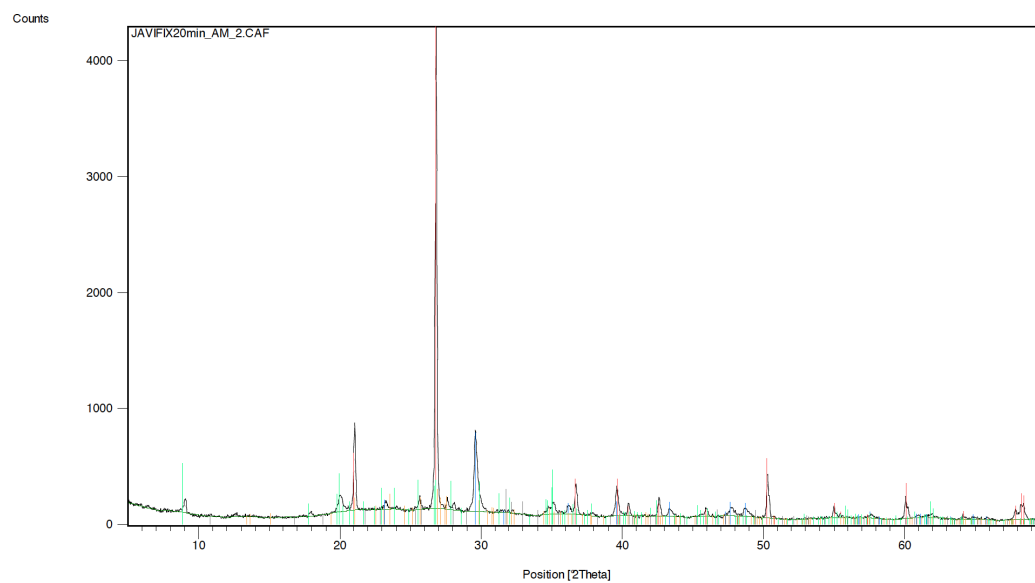
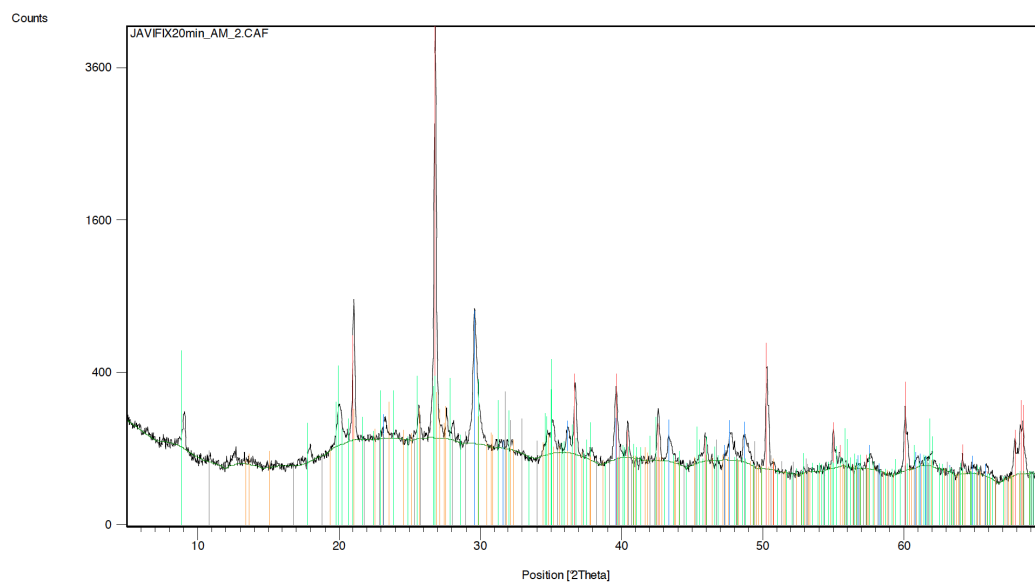
- Se basa en la medida del área de un único pico (el más intenso) por cada fase mineral identificada.
- Los “poderes reflectantes” usados para corregir el área de cada pico son valores empíricos.
- Todas las fases identificadas suman el 100%, por lo que no se consideran las posibles fases cristalinas no identificadas, ni la presencia de material amorfo (no cristalino) si lo hubiera.
- Los filosilicatos se miden conjuntamente en una única reflexión no basal, a fin de minimizar los efectos de la orientación preferente de sus partículas planares.

**TABLA 1.1** Anexo (Estimación semicuantitativa y % mineral de cada una de las muestras)

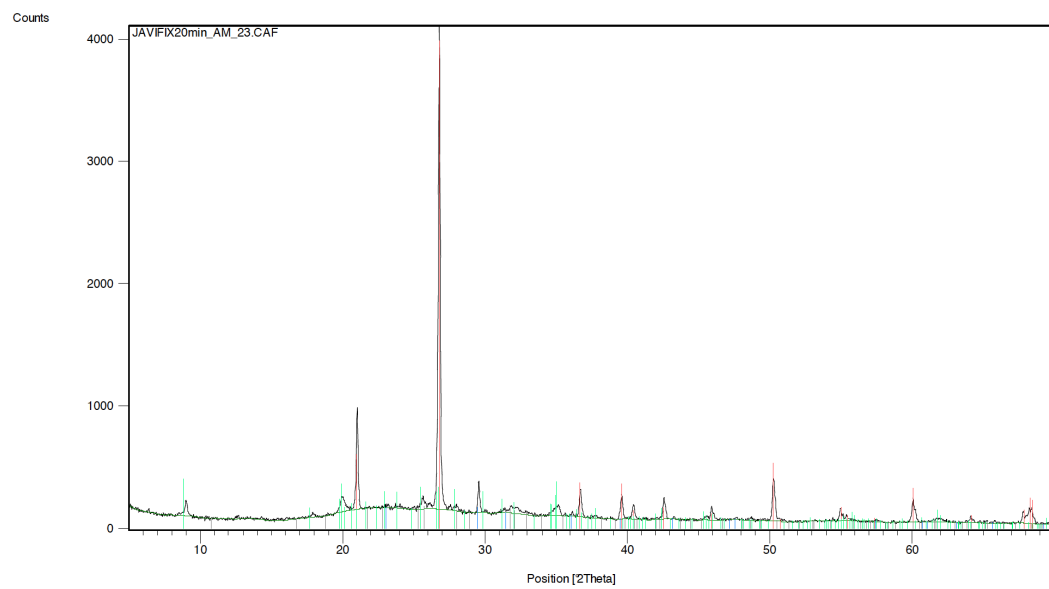
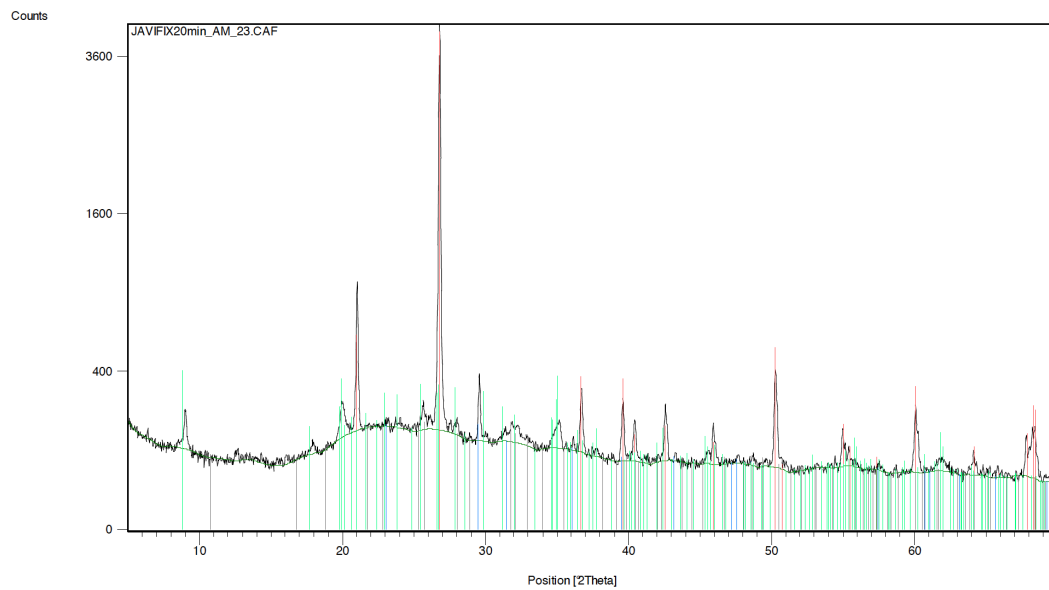
	% Cuarzo	% Calcita	% Filosilicatos	% Apatito	% Feldespato K	% Plagioclasas
AM 2	34	17	48	indicios	1	
AM23	43	4	52	1		
AM 27	32	20	41	3	2	2
AM 28	30	9	57	3	1	indicios
AM22	33	32	30	5	indicios	
AM 32	25	33	28	12	2	
AM 10	25	27	43	5		
AM 7	28	9	61	2	indicios	
AM 9	27	35	28	10		
AM 11	27	36	28	7	2	
AM 26	36	19	40	2	1	2
AM 25	31	19	39	11		
AM 16	25	41	27	7		
AM 1	39	20	29	7	4	1
AM 5	21	40	26	13		
AM 33	11	78	6	4		1

## Anexo IV. DIFRACTOGRAMAS DE LAS DIFERENTES MUESTRAS

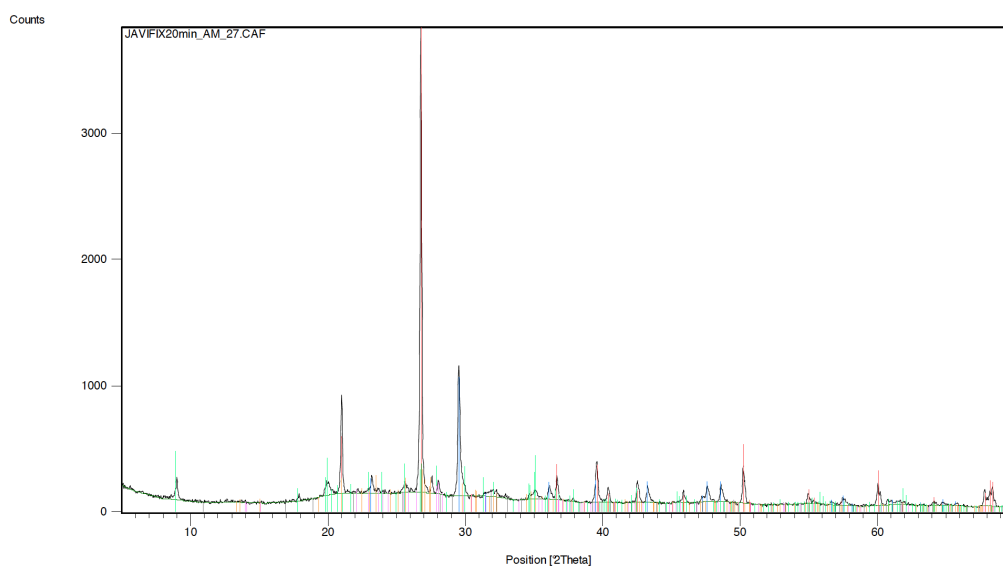
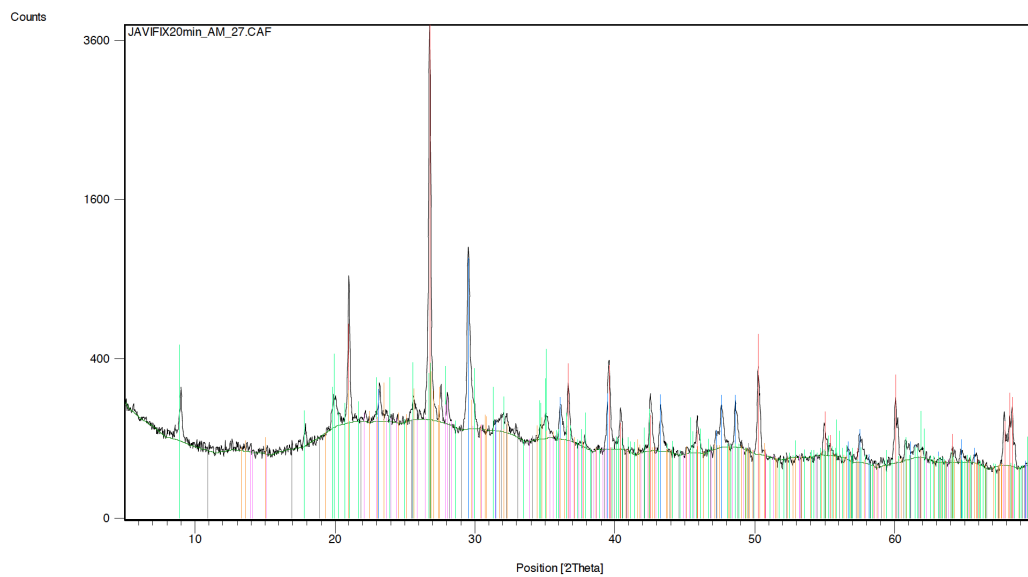
AM2



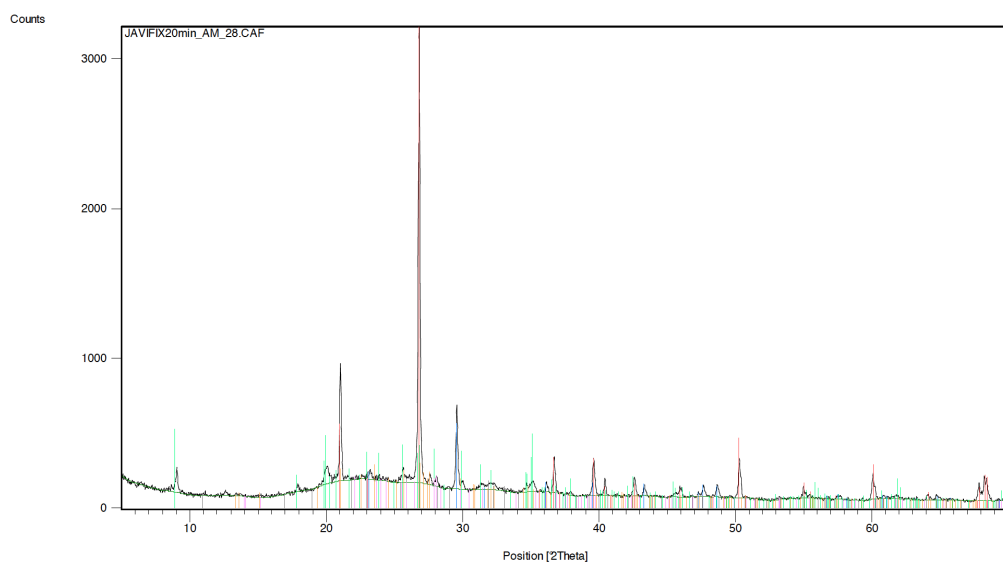
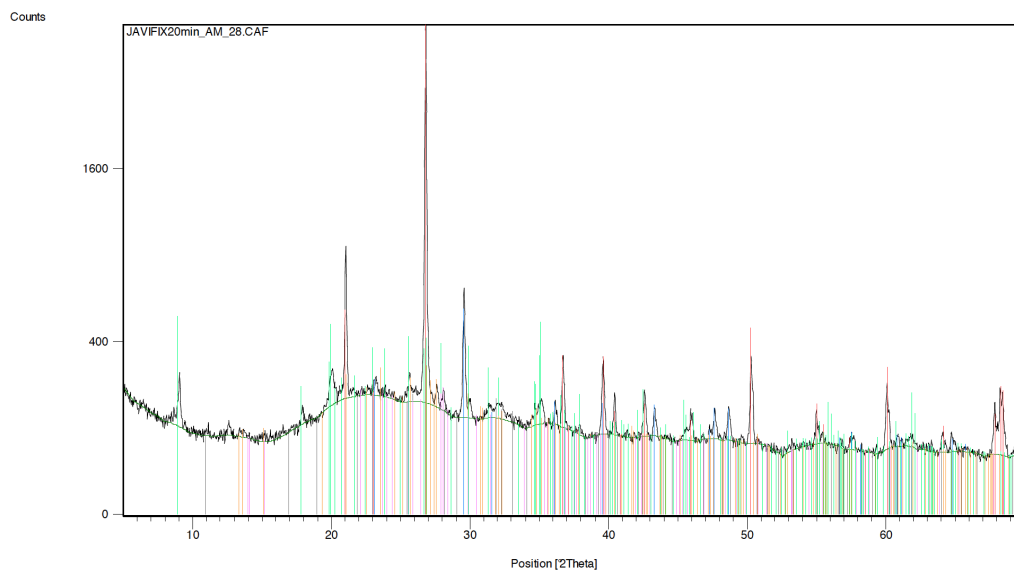
AM 23



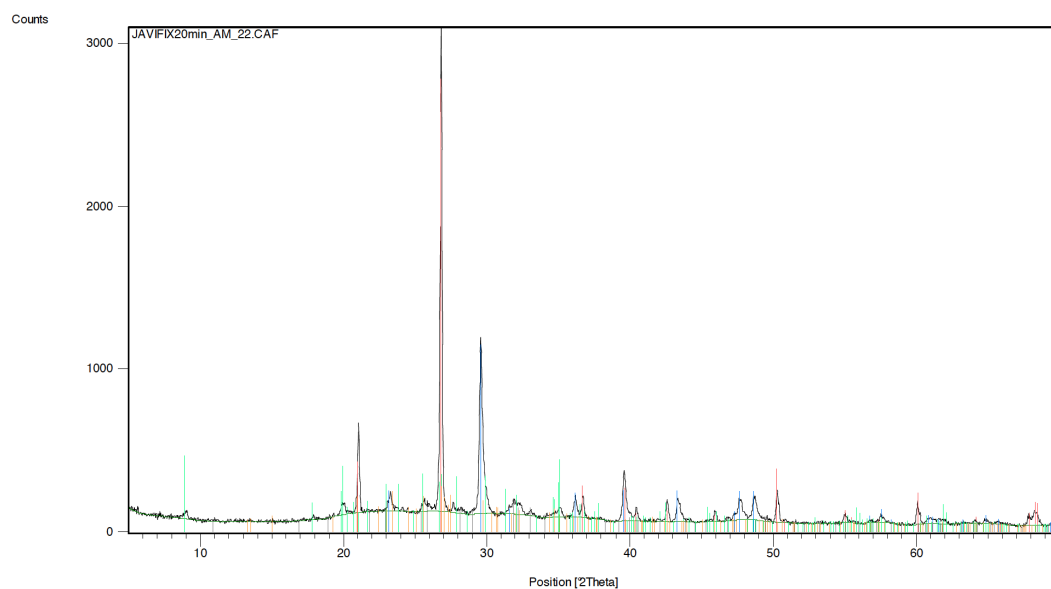
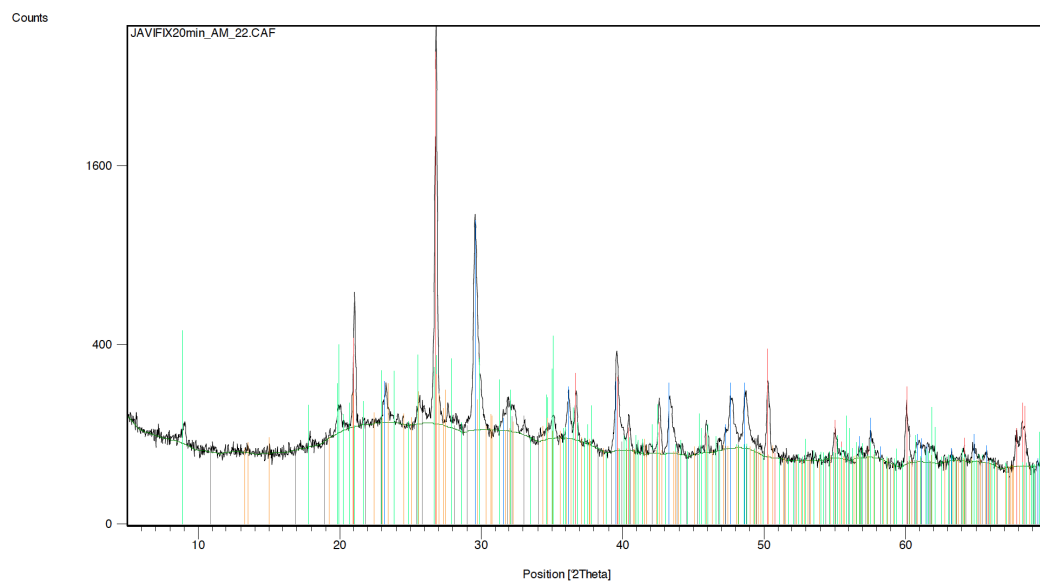
AM 27



AM 28

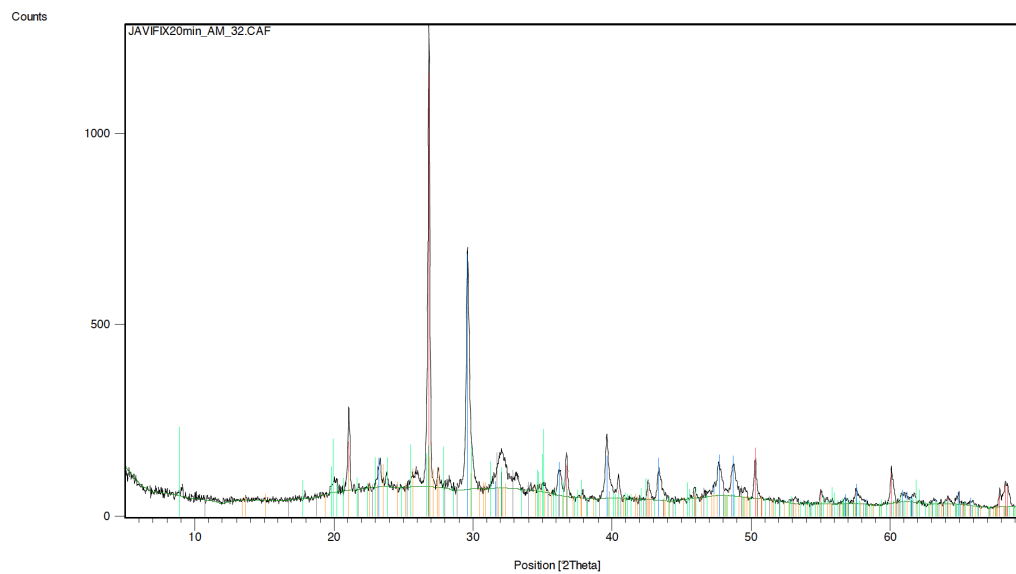
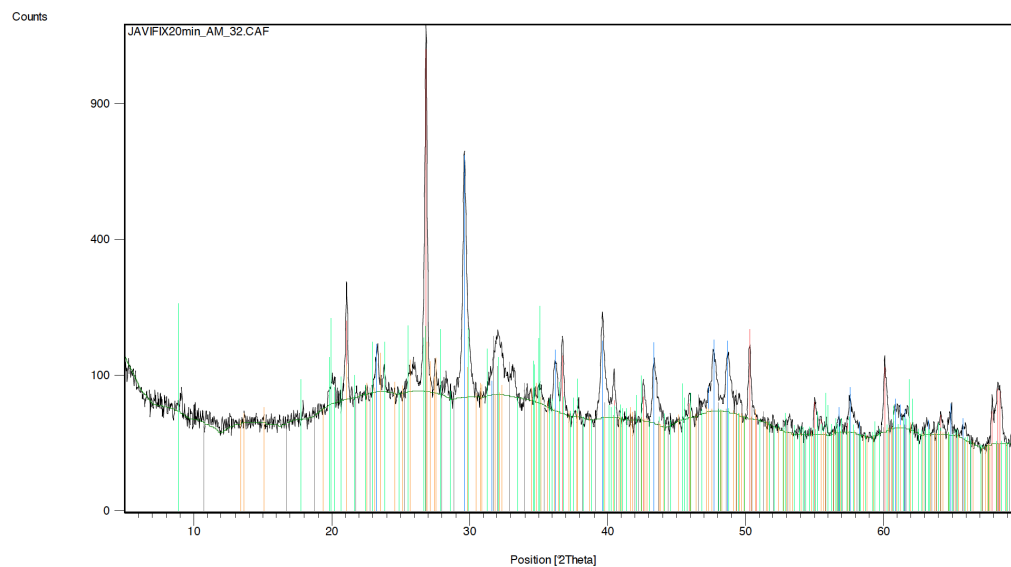


AM 22

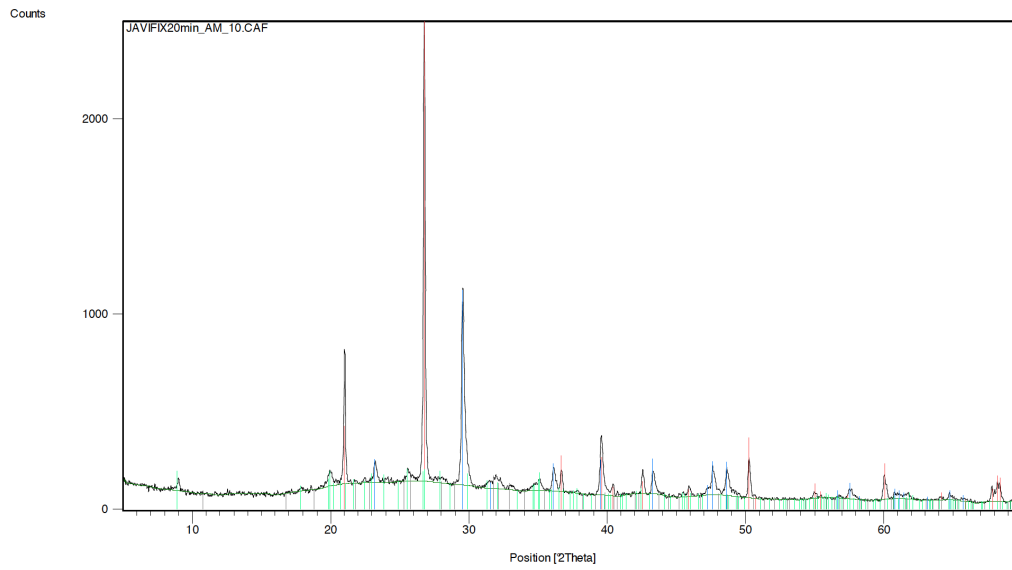
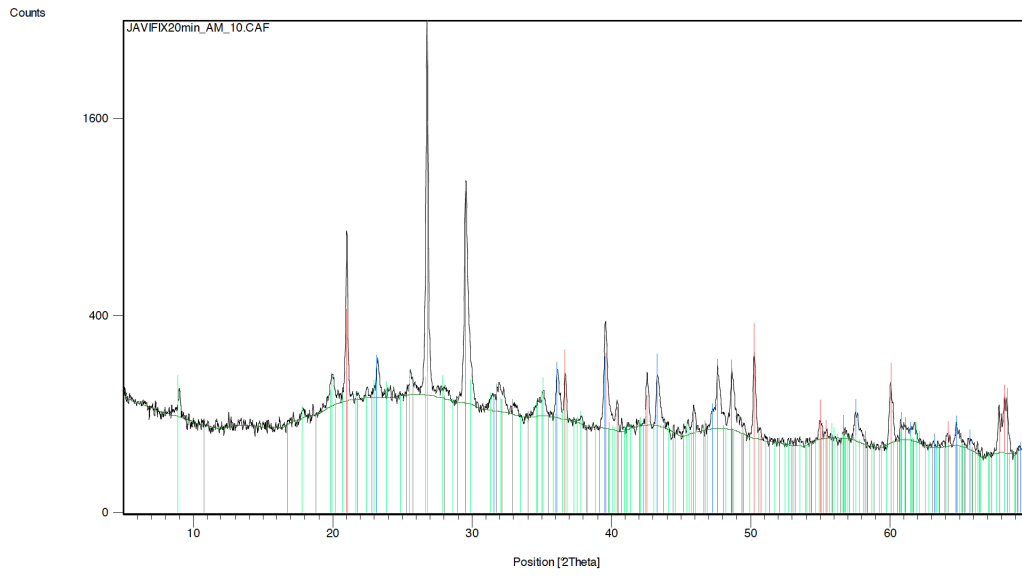




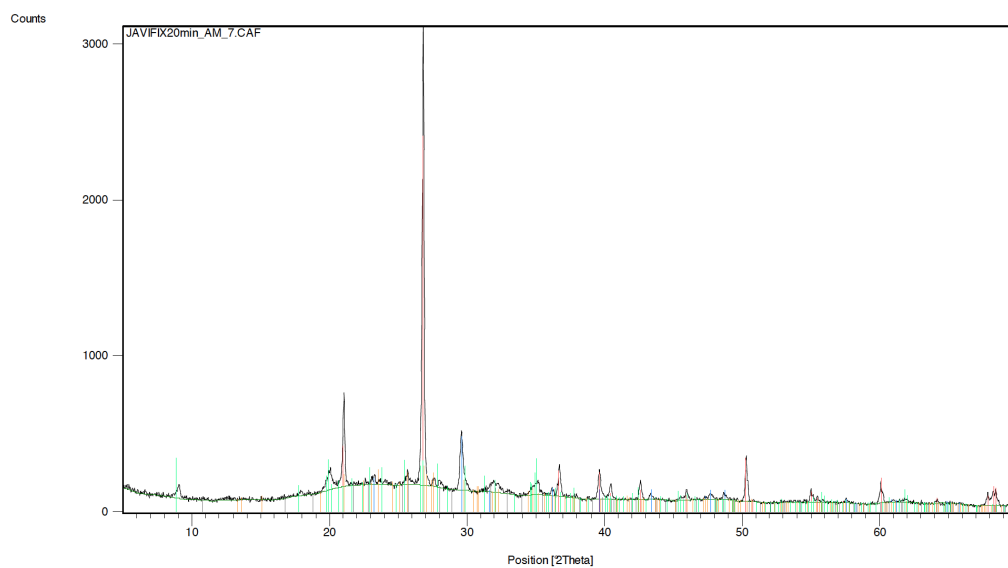
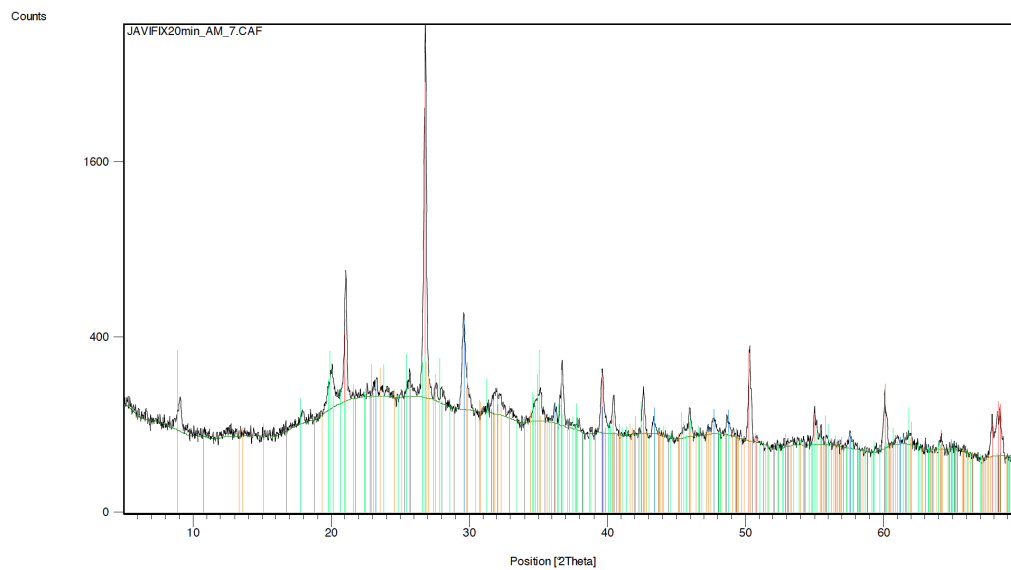
AM 32



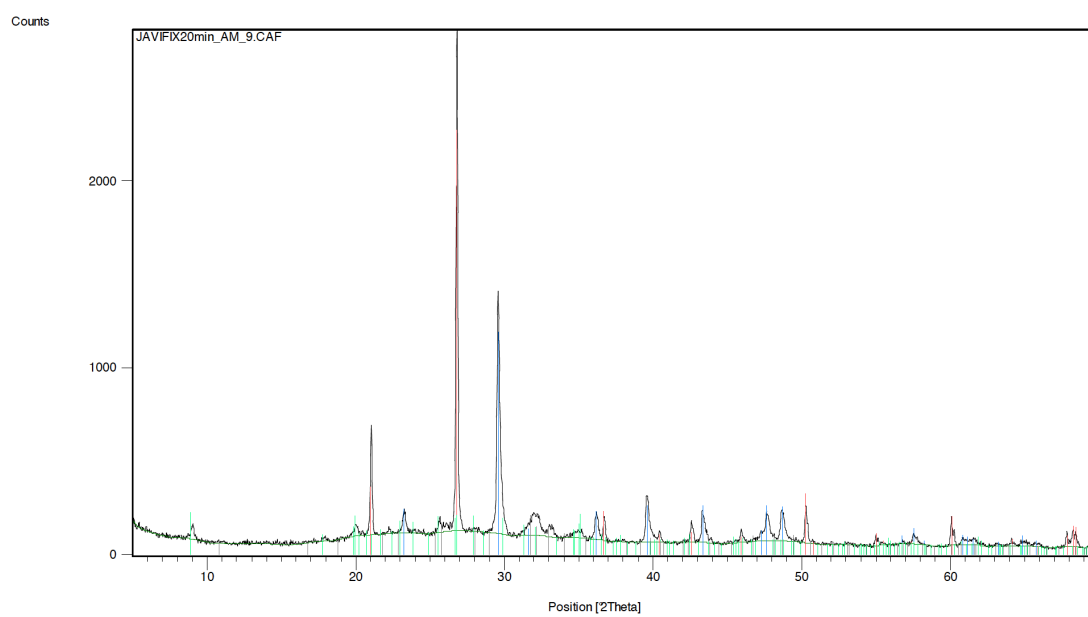
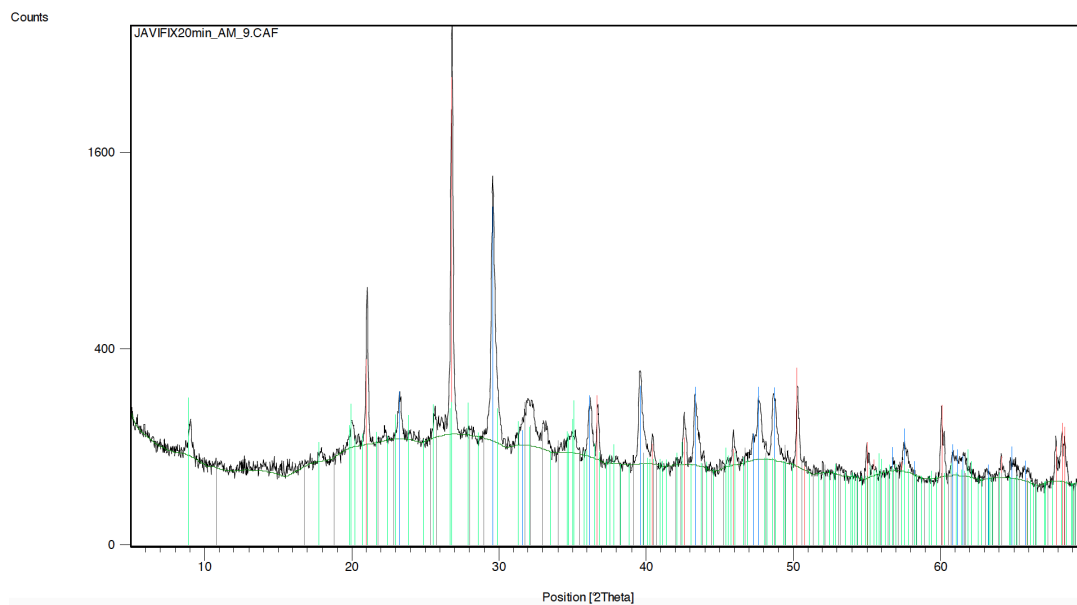
AM10



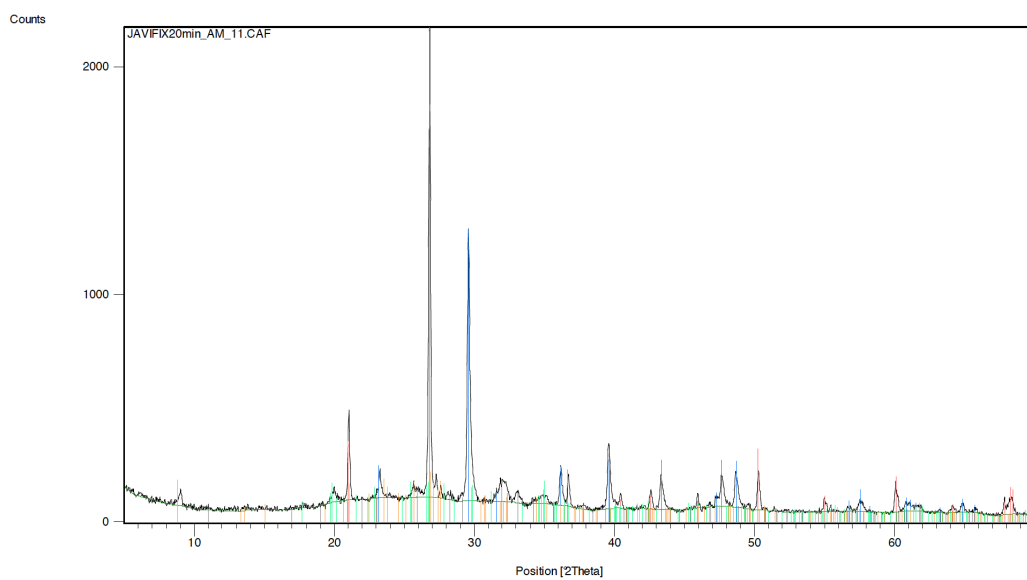
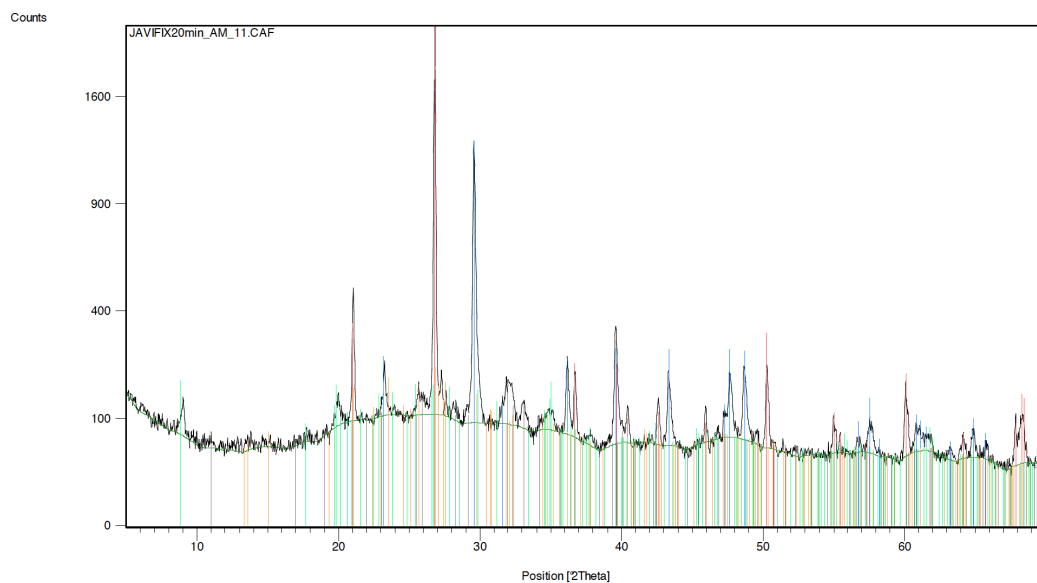
AM 7



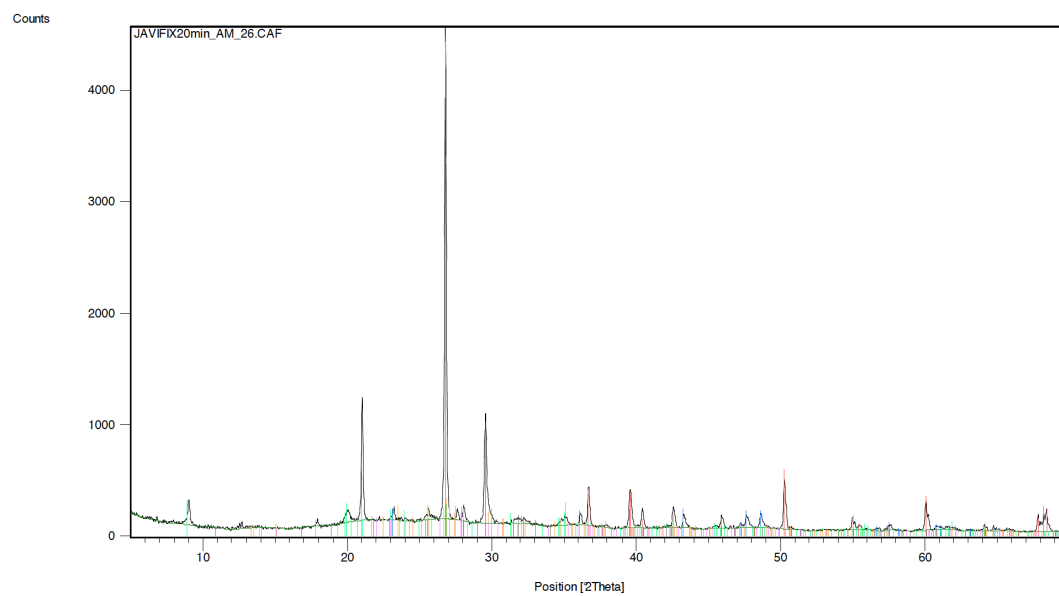
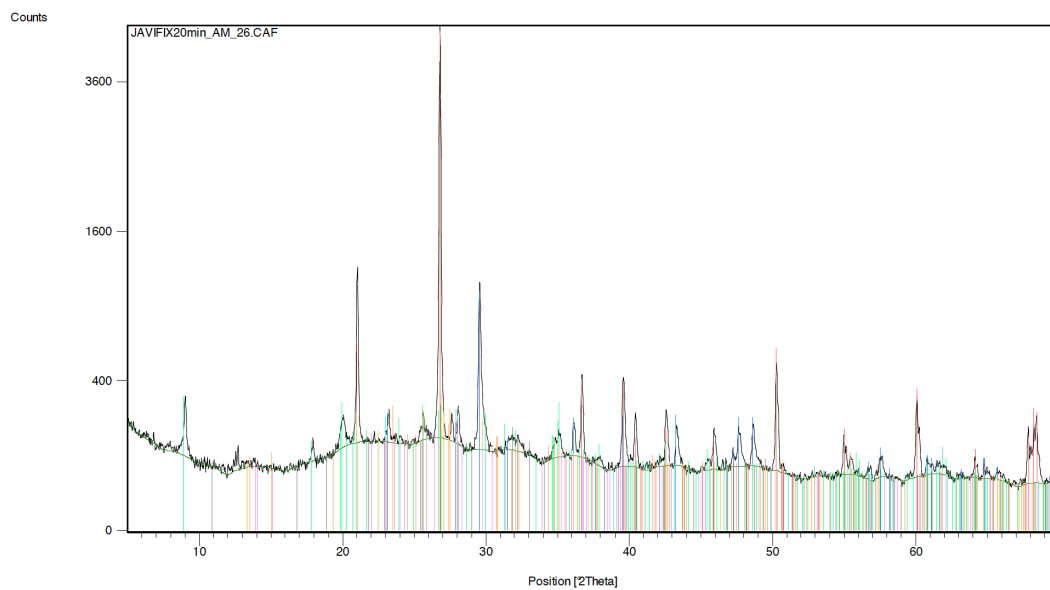
AM 9



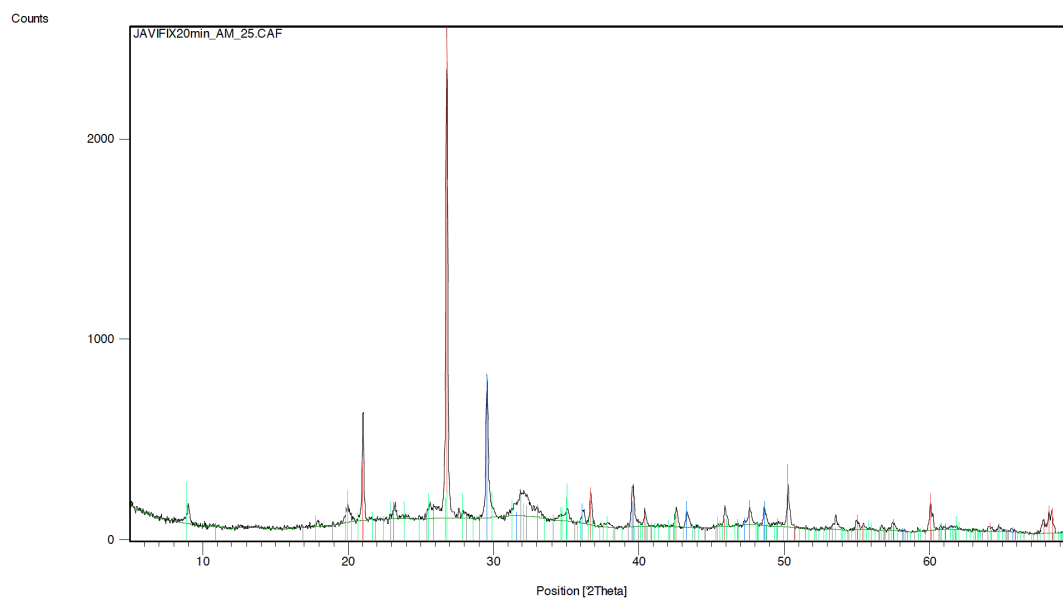
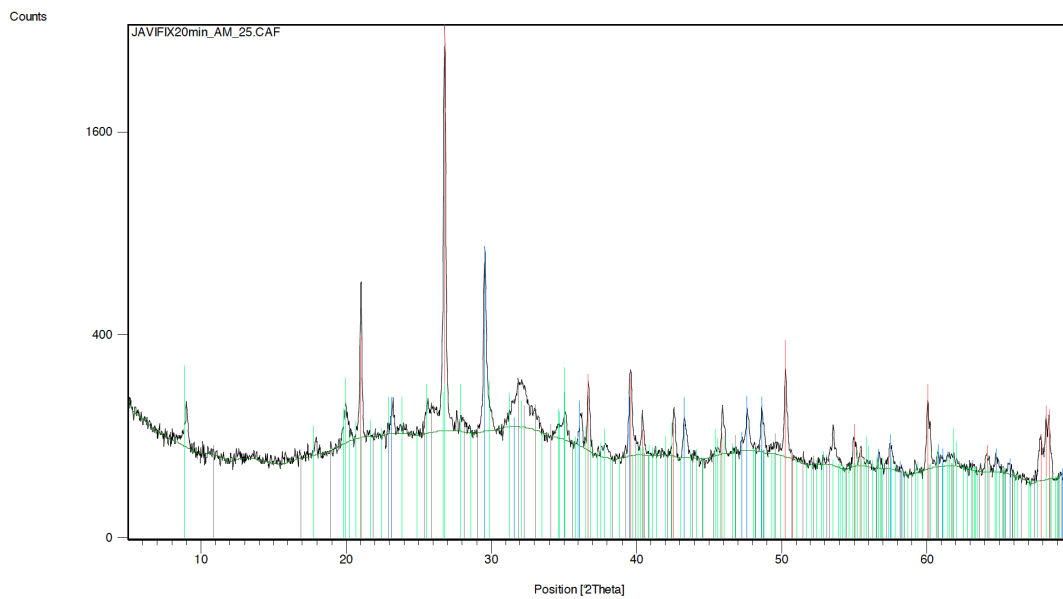
AM 11



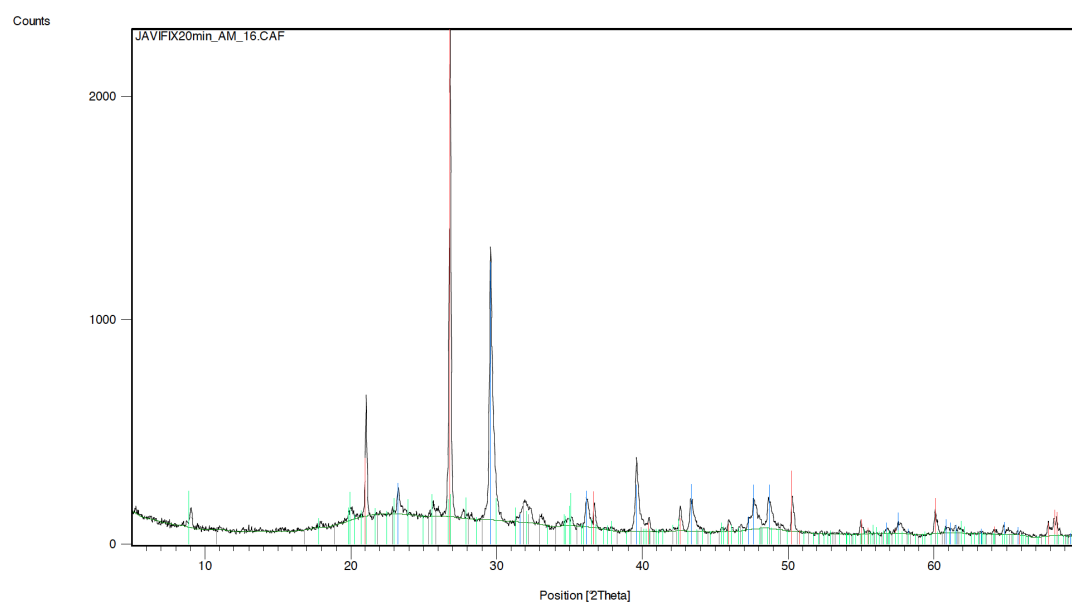
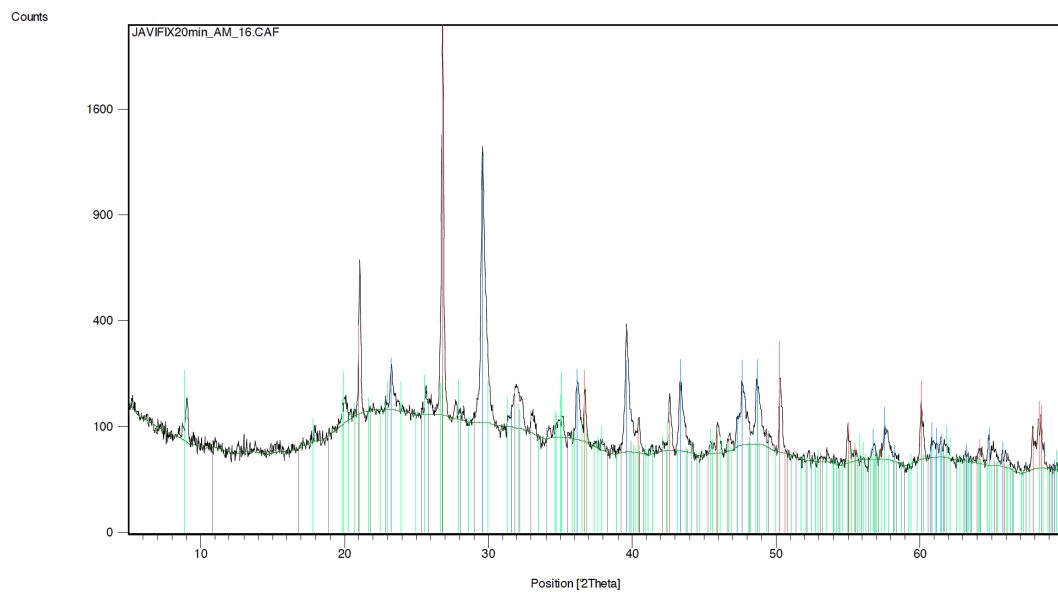
AM 26



AM 25

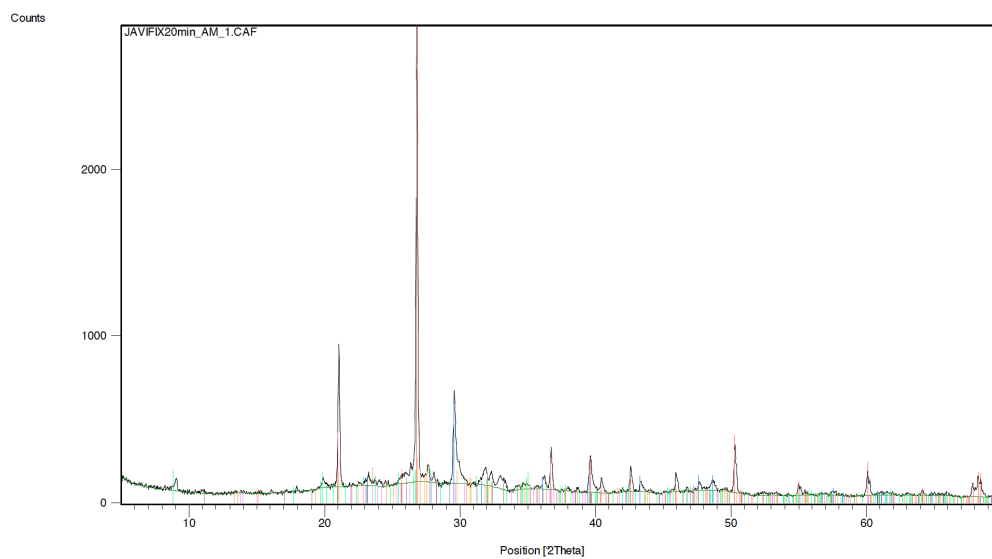
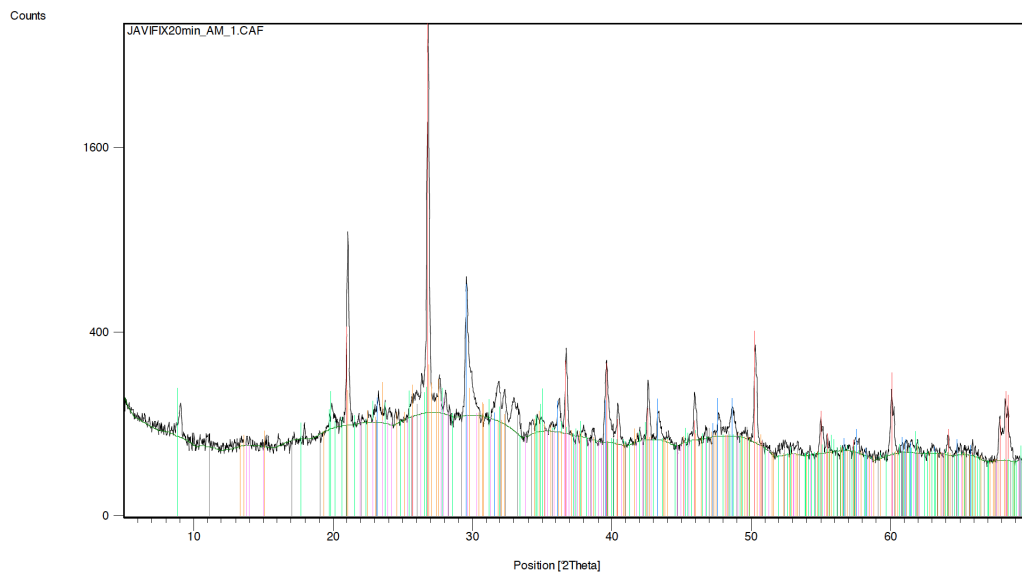


AM 16

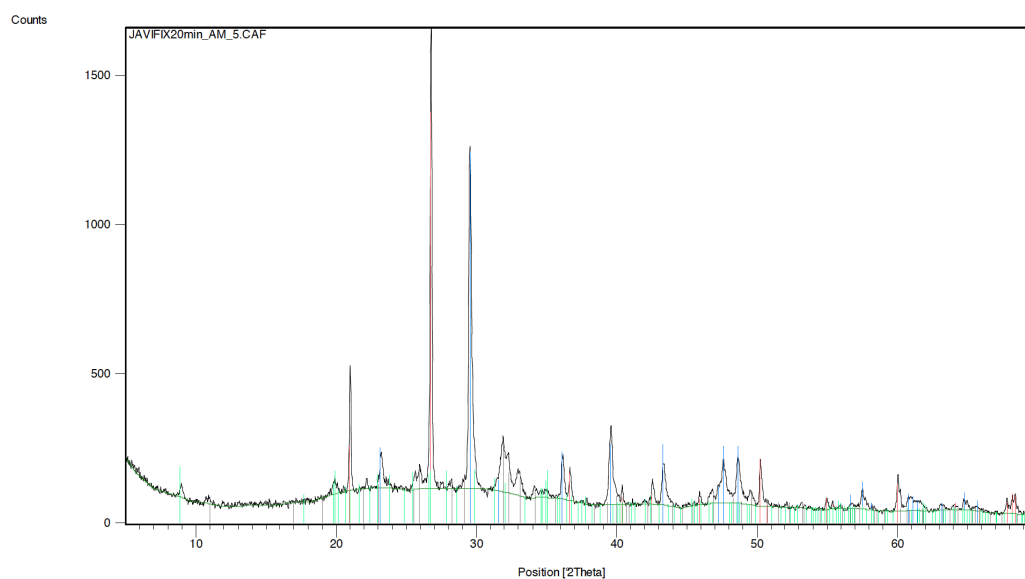
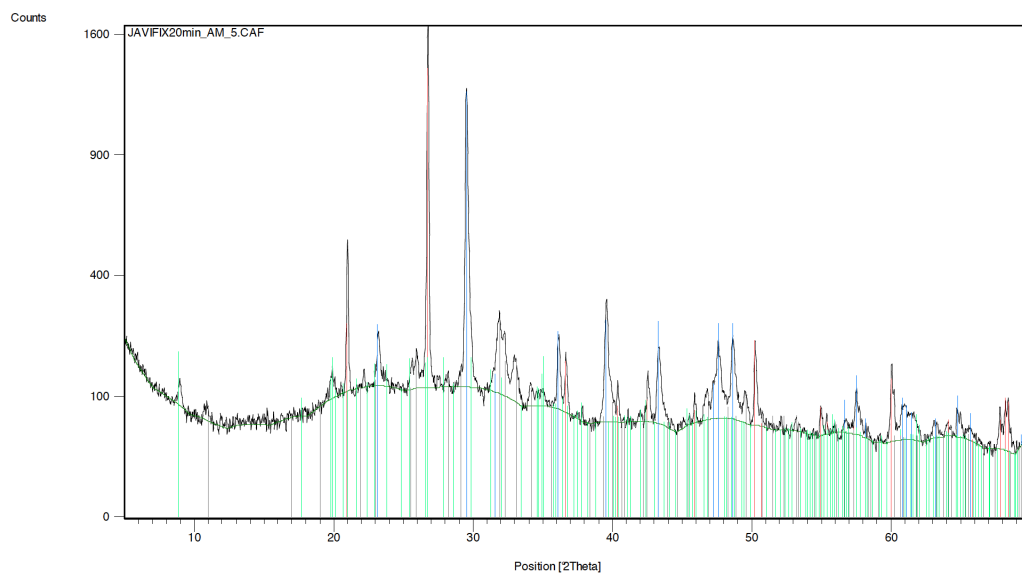




AM 1



AM 5



AM 33

