

# Datación por racemización de aminoácidos del yacimiento de *Equus caballus eaensis* Torres, 1970 de la Ría de Ea (Vizcaya)

Aminoacid racemization dating of the *Equus caballus eaensis* Torres, 1970 from the palaeontological site at Ria de Ea (Vizcaya, Spain)

Trinidad DE TORRES\*  
José EUGENIO ORTIZ\*

## RESUMEN

En este trabajo se contempla la datación del yacimiento de *Equus caballus eaensis* de la ría de Ea (Vizcaya). Una acumulación monoespecífica de restos de caballo ligada a una trampa natural. El análisis de la racemización del ácido aspártico de la dentina y el uso de algoritmos de cálculo de edad calibrados ha permitido situar el yacimiento al comienzo del Pleistoceno superior, en el episodio 5 del oxígeno marino o Eemiano.

## ABSTRACT

This paper deals with the dating of the *Equus caballus eaensis* bone and teeth deposit at the Ea estuary (Vizcaya). The palaeontological site consists of a monospecific accumulation of horse remains due to an open shaft what acted as a natural trap. The analysis of the racemization of the aspartic acid from the dentine collagen and calibrated age calculation algorithms allowed the site to be dated to the lowermost part of the Upper Pleistocene (5<sup>th</sup> Marine Isotope Stage) or Eemian.

**PALABRAS CLAVE:** Ácido aspártico. *Equus*. Pleistoceno superior. Racemización. Trampa natural.

**KEY WORDS:** Aspartic acid. *Equus*. Natural trap. Racemization. Upper Pleistocene.

Hace varias décadas (ESPEJO y TORRES, 1969; TORRES, 1970) se publicaron los restos de caballo encontrados en lo que fue una antigua sima, hoy abierta por la acción marina, en la margen derecha de la ría de Ea (Vizcaya) (Figura 1).

Esta forma kárstica se desarrolla en las calizas bioclásticas de la facies urgoniana (Cretácico inferior) que consisten en calizas negras más o menos fosilíferas con intercalaciones margo-arcillosas. Desde un punto geomorfológico se trata de una sima larga y relativamente angosta que conecta con un área somital relativamente aplanada. Muy posiblemente la karstificación aprovechó una antigua fractura. Un enorme caos de bloques, delimita el borde derecho del relleno (Lamina la). Los clastos, redondeados por la erosión química, desdibujan el lado derecho de la antigua sima. Los restos de caballo, con una organización caótica, quedan englobados en una matriz arcillo-gravelosa en la que la gravilla son pequeños clastos de margocaliza (Lamina lb y c). El material, monoespecífico, estaba bien preservado, sin restos de rodadura o arrastre. Se podían observar fragmentos craneales bastante completos (Lamina ld) y una mandíbula aunque la mayor parte del material corresponde a dientes aislados, deciduales y definitivos. Se recuperaron algunos

elementos, generalmente incompletos del esqueleto postcraneal.

Los restos de caballo fueron clasificados como *Equus caballus* var. *eaensis* TORRES 1970 en atención a las dimensiones reducidas de molares y premolares y se les atribuyó una edad Pleistoceno medio sin más precisiones. El material tipo está depositado en el Museo Geominero del Instituto y Minero de España. Varias piezas dentarias aisladas están en la colección del Museo Histórico Minero Don Felipe de Borbón y Grecia de la E.T.S. de Ingenieros de Minas de la Universidad Politécnica de Madrid, de ellas se han tomado las muestras para este estudio.

## Material y métodos

Para la datación por racemización de aminoácidos se seleccionaron cuatro piezas de *Equus caballus* var. *eaensis* Torres, 1970, depositadas en el Museo Histórico Minero D. Felipe de Borbón y Grecia de la Escuela de Minas de la Universidad Politécnica de Madrid.

Las piezas de las que se tomaron las muestras tenían las siglas siguientes: V-48 (P<sup>2</sup> dex.) V-58 (P<sup>3</sup> dex.), V-59 (P<sup>3</sup> dex.) y V-89 (M<sup>2</sup> dex.).

El Laboratorio de Estratigrafía Biomolecular de la Escuela de Minas usa, casi exclusivamente dentina para la datación de vertebrados. Se evita el uso de

\*Laboratorio de Estratigrafía Biomolecular. Escuela de Minas, Universidad Politécnica de Madrid. c/ Ríos Rosas, 21; 28003 - Madrid. E-mail: trinidad.torres@upm.es

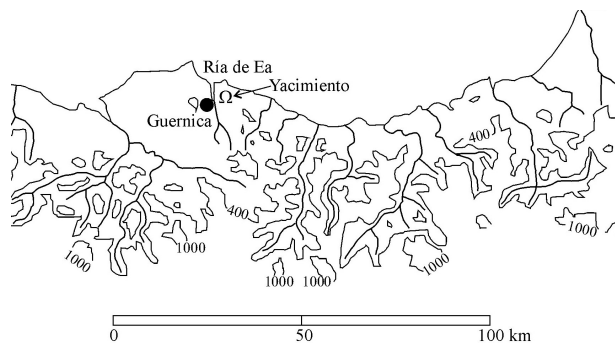


Figura 1: Localización geográfica del yacimiento de la Ría de Ea

hueso ya que son más sensibles ante la diagénesis temprana que se refleja en la aparición de relaciones de racemización espúreas (MASTERS, 1987).

Las muestras de dentina se obtuvieron perforando con una broca fina de diamante entre los repliegues internos del esmalte, desechándose el polvo obtenido de la zona más externa (3 mm) con el fin de minimizar posible contaminación reciente. Un ligero calentamiento de la muestra es inevitable.

Antes de la hidrólisis del colágeno, las muestras fueron tratadas para eliminar los aminoácidos libres mediante un proceso de diálisis. Con este proceso se eliminan no sólo los aminoácidos libres también aportes recientes de contaminación, obteniéndose un extracto homogéneo del colágeno. El método utilizado es una variante del propuesto por Marzin (1990), descrito en TORRES *et alii* (1999). La muestra en polvo (5.5-16 mg de dentina) se disolvió en 1 ml de ácido clorhídrico 2N y sonicada. Tras la adición de 5 ml de tampón PBS el líquido resultante se dializó a 3500 Dalton (membrana Spectra/Por mnc 3500) durante 24 h en solución tamponada con agitación magnética a temperatura ambiente. El dializado se evaporó a sequedad al vacío.

El vidrio empleado para los análisis (excepto las pipetas Pasteur) se limpió por calcinación en un horno a 500° C durante 2 h. Los microtubos de análisis Eppendorf de plástico y las pipetas Pasteur fueron desechadas en cada muestra. Los tapones y septa de Teflón se lavaron cuidadosamente con éter de petróleo, acetona y se enjuagaron tres veces con agua ultralimpia. Toda el agua empleada en los análisis fue de calidad Milli-Q de Millipore. El ácido clorhídrico fue de Merck grado analítico.

La hidrólisis se realizó en ácido clorhídrico 7 N (20 µl/mg) en viales de 4 ml con tapones de rosca recubiertos de Teflón, cerrados bajo atmósfera de nitrógeno, en una estufa a 100° C durante 20 h. Posteriormente se evaporó bajo vacío (tapones sin

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Flujo (ml/min)	Observaciones
0	95	5	0	1	
31	76,6	23	0,4	1	Análisis
83	51	44	5	1	
84	0	95	5	1	Limpieza
99	0	95	5	1	
100	95	5	0	1	Equilibrado para el siguiente análisis
115	95	5	0	1	

Tabla 1: Condiciones de análisis por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC). A: agua+acetato de sodio trihidratado+EDTA a pH 6; B: metanol; C: acetonitrilo.

LEB Ref.	Muestra	Asp D	Asp L	D/L Asp	Glu D	Glu L	D/L Glu	Edad Asp (ka)
6014	V58	24665,1	141113	0,175	9982,6	209191	0,048	123,6
6015	V59	8245,6	59968	0,138	2723,6	78055	0,035	95,8
6016	V89	15594,8	114111	0,137	3569,7	120967	0,030	95,1
6017	V48	15664,9	116445	0,135	4108,0	143052	0,029	93,5

Tabla 2: Relaciones de racemización obtenidas en las muestras de *Equus caballus* var. *eaensis* de la Sima de los Huesos de la ría de Ea (Vizcaya). La edad calculada para cada muestra a partir de la racemización del ácido aspártico (última columna) está en kiloaños.

acabar de desenroscar) en el desecador de plástico.

Previamente al análisis la muestra se redisolvió en ácido clorhídrico 0.01 N (20 µl/mg) y se transfirió a viales de inyección.

Se inyectaron 2 µl de la muestra en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1100. La derivatización tuvo lugar en el inyector automático mediante la adición de 4 µl del reactivo OPA/IBLC (45,6 mg de O-phtaldialdehide-OPA- y 99,4 mg de N-isobutiryl-L-cysteine-IBLC- disueltos en 2 ml de borato potásico a un pH de 10.4). Se utilizaron tres fases móviles:

A: H<sub>2</sub>O HPLC con 3,13 g de acetato de sodio trihidratado, 275 mg de EDTA y 100 mg de azida sódica. Se ajustó el pH a 6 añadiendo gotas de hidróxido de sodio 10M.

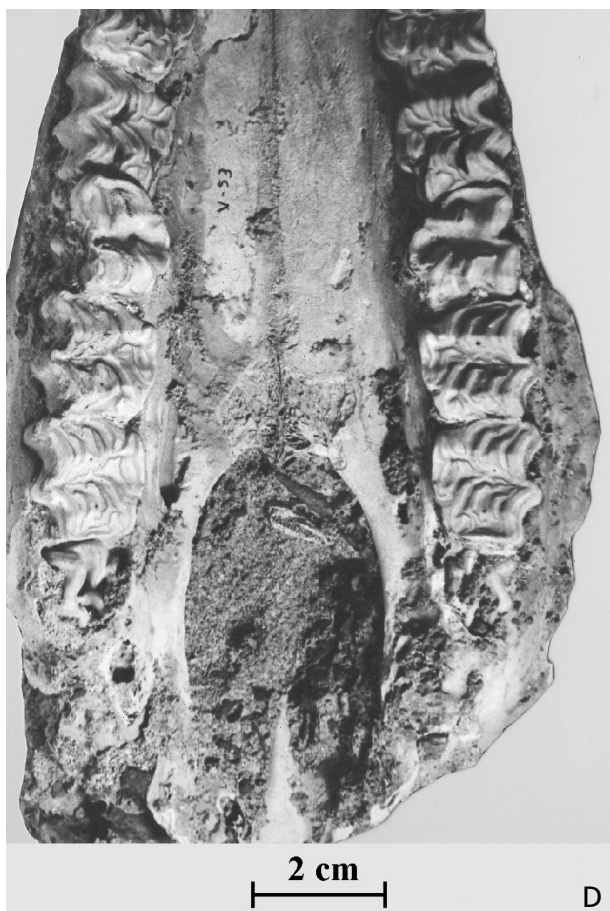
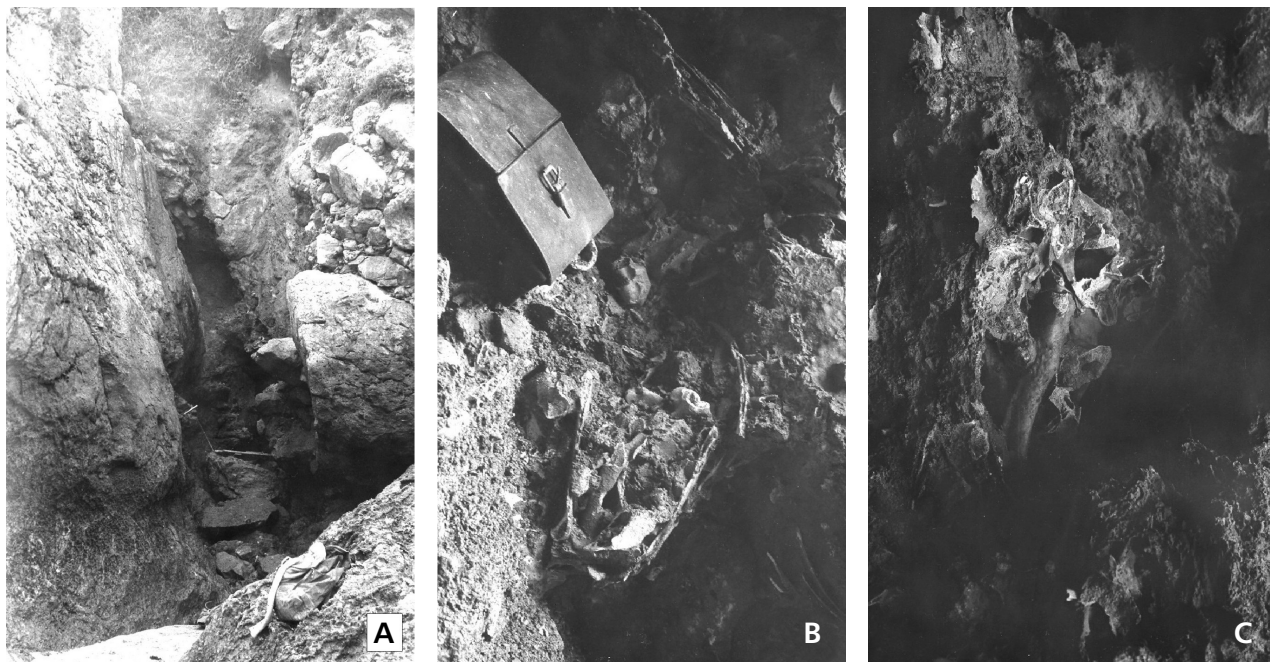
B: Metanol grado gradiente HPLC

D: Acetonitrilo grado gradiente HPLC.

La columna fue de tipo Hypersil DBS C18 (250 x 4 mm). Las condiciones de análisis figuran en la Tabla 1.

## Resultados

Los valores de racemización/epimerización de ácido aspártico, ácido glutámico y serina aparecen en la tabla 2 aunque la cronología se estableció a partir de la racemización del ácido aspártico.



Lamina I: a) Vista de la Sima de los Huesos en 1968; b) el relleno con restos de caballo donde el cráneo casi completo es visible en la foto (la longitud del estuche de cuero es de 25 cm); c) otra vista del relleno paleokárstico con un metápodo visible; d) vista palatal de un cráneo de *Equus caballus eanensis* (V-53), actualmente expuesto en el Museo del Instituto Geológico y Minero de España.

### Aminocronología

La aminocronología consiste en la transformación de las relaciones de racemización obtenidas en el análisis en edades numéricas. No obstante, este método de datación no lo es *per se* y precisa de un calibrado previo mediante el establecimiento de relaciones de correlación entre ratios de racemización y edades numéricas obtenidas a partir de dataciones radiométricas.

Los valores de racemización D/L del ácido aspártico de las muestras de *Equus caballus eanensis* se introdujeron en el algoritmo de cálculo de edades establecido para el colágeno de la dentina de osos fósiles de la Península Ibérica (*Ursus deningeri* y *Ursus spelaeus*), modificado de TORRES *et alii* (2001a; 2001b; 2002). A pesar de que la racemización es un proceso género (zoológico)-dependiente, se ha comprobado que las diferencias de racemización en el colágeno de mamíferos despreciable para los propósitos de datación.

Para definir el algoritmo de cálculo de edad se emplearon un buen número de muestras datadas por métodos diferentes:  $C_{14}$  en huesos (Cueva Eirós; GRANDAL D'ANGLADE y VIDAL ROMANÍ, 1997), U/Th en espeleotemas (Cueva de la Lucía, Cantabria; TORRES *et alii.*, 2001b), resonancia de espín electrónico (ESR), series del uranio en dientes de oso (Sima de los Huesos, Burgos; BISCHOFF *et alii.*, 1997), dataciones sin publicar por ESR en dientes de osos (Cueva de Amutxate, Navarra; Cueva de Troskaeta, Guipúzcoa; Cueva de Santa Isabel, Vizcaya; Cuevas de La Lucía y La Pasada, Cantabria).

El algoritmo resultante de cálculo de edades (Figura 2) a partir de la relación de racemización del ácido aspártico es:

$$t = -5,072 + 364,31 \ln [(1+D/L)/(1-D/L)]$$

$$r=0,91; p=0,00$$

La edad numérica de las muestras se obtuvo introduciendo los datos de relaciones D/L aspártico en el algoritmo. Dado que se detectaron variaciones entre muestras, se prefirió calcular el valor medio de las edades obtenidos individualmente para cada muestra. La incertidumbre (error) de la edad es la desviación típica de los valores de edad obtenidos.

Los valores obtenidos resultan ser muy consistentes en tres de las muestras, mientras que otra (V58) da una edad bastante superior.

Si sola mente se consideran los tres valores similares, la edad del yacimiento sería de  $94,8 \pm 1,1$  ka. Si se consideran las cuatro conjuntamente la edad sería de  $102 \pm 14,4$  ka. Caben dos interpretaciones posibles. En el primer caso la medida anómala correspondería a un artefacto correspondiente a una racemización acelerada debido a las condiciones tafono-diagenéticas del sitio.

### Conclusiones

Se ha datado el yacimiento de vertebrados fósiles de la ría de Ea, Vizcaya, acumulación mono-específica de *Equus caballus* *eaensis*. La edad numérica corrige la posición cronoestratigráfica de estos restos definida a partir del análisis biométrico y morfológico, que pasa a estar situada al comienzo del Pleistoceno superior. Supuestamente la sima actuó como una trampa natural

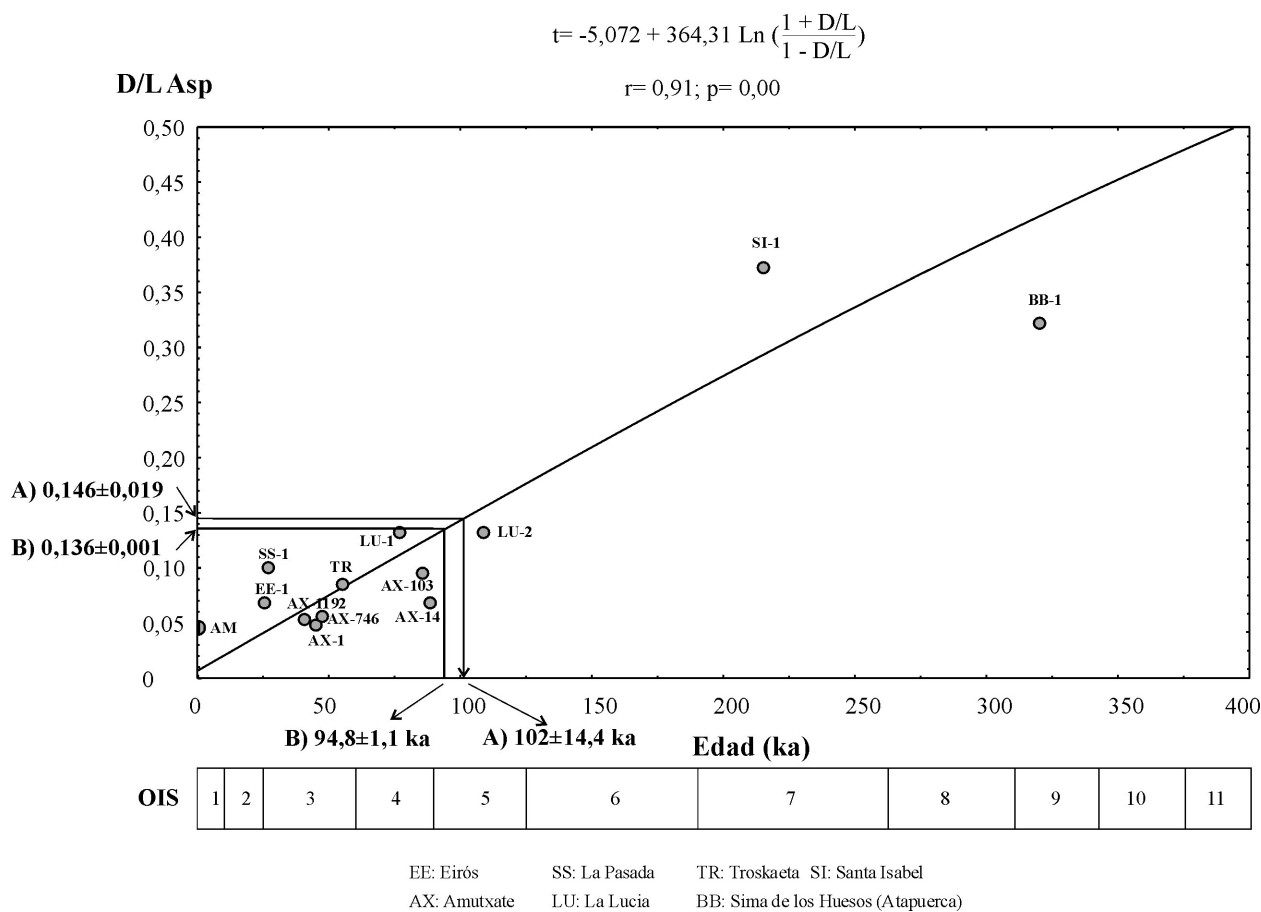


Figura 2: Cálculo de la edad de los restos de *Equus caballus* *eaensis* Torres del yacimiento de la Ría de Ea introduciendo la relación D/L del ácido aspártico del colágeno de la dentina en el algoritmo de cálculo de edad establecido a partir del D/L Asp del colágeno de la dentina de osos (*Ursus deningeri* y *Ursus spelaeus*) de diferentes localidades de la Península Ibérica (modificado de Torres *et al.* (2001b, 2002). A) representa el valor medio de las cuatro muestras analizadas. B) representa el valor medio de las muestras con valores de racemización similares (V59, V89 y V48, ver Tabla 2). Los círculos representan las localidades de oso datadas por diferentes métodos: <sup>14</sup>C en huesos (Cueva de Eirós, Galicia; Grandal d'Anglade y Vidal Romaní, 1997), U/Th en espeleotemas (Cueva de la Lucia, Cantabria; Torres *et al.* 2001b), resonancia electro spin (ESR) y series del uranio en dentición de oso (Sima de los Huesos, Burgos; Bischoff *et al.*, 1997) y dataciones no publicadas obtenidas mediante ESR en dentición de oso (Cueva de Amutxate, Navarra; Cuevas de Troskaeta y Santa Isabel, Vizcaya; Cuevas de la Lucia y La Pasada, Cantabria).

dada la falta de huellas de acción antrópica, la conservación de grandes piezas óseas (cráneos y metápodos) y la paleotopografía del sitio, difícilmente penetrable por homínidos dada su profundidad y escarpamiento, se trató de un proceso dilatado en el tiempo.

En cualquier caso, los restos de *Equus caballus eanensis*, corresponden a unos animales que habitaron la zona durante el quinto episodio del oxígeno marino (OIS o MIS 5), momento cálido de alto nivel del mar que, muy posiblemente, estaba a una cota similar a la actual.

## Bibliografía

- BISCHOFF, J. L., FITZPATRICK, J. A., FALGUERES, C., BAHAIN, J. J., BULLEN, T. (1997): "Geology and preliminary dating of the hominid-bearing sedimentary fill of the Sima de los Huesos Chamber, Cueva Mayor of the Sierra de Atapuerca, Burgos, Spain", *Journal of Human Evolution* 33, 129-154.
- ESPEJO, J. y TORRES, T. (1969): "Nota previa sobre el descubrimiento de un yacimiento de fósiles cuaternarios en la ría de Ea (Vizcaya)", *Boletín Geológico y Minero LXXX-2*, Madrid, 25-26.
- GRANDAL D'ANGLADE, A. y VIDAL ROMANÍ, J. R. (1997): "Population study on the cave bear (*Ursus spelaeus* Ros.Hein.) from Cova Eirós (Triacastela, Galicia, Spain)", *Geobios* 30-5, 723-731.
- MASTERS, P. M. (1987): "Preferential preservation of non collagenous protein during bone diagenesis: Implications for chronometric and stable isotopic measurements", *Geochim. Cosmochim. Acta* 51, 3209-3214.
- MARZIN, E. (1990): "Essai de normalisation du protocole d'analyse des taux de racémisation de acides aminés: applications a la datation d'ossements fossiles", *Trav. Du L.A.P.M.O.* 27, 167-178.
- TORRES, T. (1970): "Un caballo microdonte del Pleistoceno medio de Vizcaya", *Boletín Geológico y Minero LXXXI-4*, Madrid, 569-585.
- TORRES, T., LLAMAS, F. J., CANOIRA, L., GARCÍA-ALONSO, P., ORTIZ, J. E. (1999): "Estratigrafía Biomolecular. La racemización/ epimerización de aminoácidos como herramienta geocronológica y paleotermométrica", ENRESA, Publicación Técnica 09/99,
- TORRES, T., LLAMAS F. J., CANOIRA, L., ORTIZ, J. E., GARCÍA DE LA MORENA M. A. y JULIÁ, R. (2001a): "Aspartic acid based aminostratigraphy of Spanish *Ursus deningeri* von Reich. and *Ursus spelaeus* Ros.-Hein. Localities", *Beitrage zur Paläontologie* 25, 177-182.
- TORRES, T., ORTIZ, J. E., GARCÍA, M. J., LLAMAS, F. J., CANOIRA, L., GARCÍA DE LA MORENA M. A., JULIÁ, R. (2001b): "Geochemical Evolution of amino acids in Pleistocene bears", *Chirality* 13-8, 517-521.
- TORRES, T., ORTIZ, J. E., LLAMAS, F. J., CANOIRA, L., JULIÁ, R., GARCÍA-MARTÍNEZ, M. J. (2002): "Bear Dentine Aspartic Acid Racemization Analysis, Proxy for Pleistocene Cave Infills Dating", *Archeometry* 44-3, 417-426.

