

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Beni Culturali e Ambientali

Ciclo XXXIV

Settore Concorsuale: 05/B1

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/08

**Paleoproteomica e osteoarcheologia: determinazione di sesso e
specie da resti ossei frammentari**

Presentata da: Sara Silvestrini

Coordinatore Dottorato

Prof. Roberto Pasini

Supervisore

Prof. Stefano Benazzi

Co-supervisor

Dott. Federico Lugli

Dott. Matteo Romandini

Esame finale anno 2022

Abstract

La buona riuscita delle analisi archeozoologiche e antropologiche è molto condizionata dallo stato di conservazione in cui si trova il reperto da analizzare. Soprattutto nei siti paleolitici, l'alto tasso di frammentazione dei resti può ostacolare l'ottenimento delle informazioni, compromettendo la comprensione del contesto preso in esame. Il presente studio ha avuto come scopo quello di sperimentare e proporre un protocollo metodologico che supportasse l'approccio morfologico tradizionale combinandolo con quello proteomico. Diverse sono le problematiche affrontate: la penuria di informazioni tassonomiche ricavabili da contesti paleolitici con ossa particolarmente frammentate, l'impossibilità di ottenere dati sulla stima del sesso in individui non adulti e la limitata attendibilità nell'ottenimento della determinazione del sesso negli individui privi dei distretti scheletrici sessualmente dimorfici. Nel primo caso, lo studio morfologico di resti provenienti da contesti di transizione tra Paleolitico medio e superiore è stato combinato alla ZooMS (Zooarchaeology by mass spectrometry) una tecnica di peptide mass fingerprinting che permette di identificare la specie di un frammento osseo tramite l'analisi della proteina più abbondante all'interno delle ossa, il collagene I. L'analisi dell'amelogenina, una proteina contenuta all'interno dello smalto dentale, è stata proposta come metodo alternativo per la stima del sesso, applicata a diversi casi studio per avvalorare la sua affidabilità. Il metodo qui proposto ha permesso di rendere informativi dei frammenti ossei e dentari indeterminati che normalmente non avrebbero contribuito, se non marginalmente, alle analisi archeozoologiche e antropologiche.

Paleoproteomica e osteoarcheologia: determinazione di sesso e specie da resti ossei frammentari

Introduzione	1
<i>Studio delle proteine applicato all'archeologia</i>	<i>1</i>
<i>ZooMS (Zooarchaeology by Mass Spectrometry)</i>	<i>6</i>
<i>Conseguenze della diagenesi sulle analisi di spettrometria di massa</i>	<i>11</i>
<i>Utilizzo della ZooMS in contesti di transizione tra Paleolitico medio e superiore</i>	<i>13</i>
Scopi e obiettivi	16
Metodi	17
<i>Analisi archeozoologiche e tafonomiche</i>	<i>17</i>
<i>Analisi proteomiche (ZooMS)</i>	<i>18</i>
Applicazioni ZooMS:	21
○ <i>Combinare la ZooMS e l'archeozoologia</i>	<i>21</i>
1. Uluzzo C	21
1.1 Il sito e gli scavi archeologici	21
1.2 Materiali analisi archeozoologiche e proteomiche	24
1.3 Risultati analisi archeozoologiche	25
1.4 Risultati analisi tafonomiche	32
1.5 Risultati ZooMS	34
1.6 Discussione	36
2. Riparo del Broion	38
2.1 Il sito e gli scavi archeologici	38
2.2 Materiali analisi archeozoologiche e proteomiche	41
2.3 Risultati analisi archeozoologiche	42
2.3.1 Unità stratigrafica musteriana US11	42
2.3.1.1 Risultati analisi tafonomiche US11	48
2.3.1.2 Sfruttamento del castoro nell'US11 del Riparo del Broion	51
2.3.2 Livello uluzziano US1g e 1f	55

2.3.2.1 Risultati analisi tafonomiche US1g e 1f	60
2.4 Risultati analisi proteomiche (ZooMS)	62
2.4.1 Unità stratigrafica musteriana US11	62
2.4.2 Livello uluzziano US1g e 1f	64
2.5 Discussione	68
3. Roccia San Sebastiano	75
3.1 Il sito e gli scavi archeologici	75
3.2 Materiali analisi archeozoologiche e proteomiche	78
3.3 Risultati analisi archeozoologiche	78
3.4 Risultati analisi tafonomiche	83
3.5 Risultati analisi proteomiche (ZooMS)	86
3.6 Discussione	89
○ <i>Utilizzo della ZooMS come pre-screening</i>	91
1. Grotta del Cavallo	91
1.1 Il sito	91
1.2 Insieme faunistico	92
1.3 Materiali analisi proteomiche	93
1.4 Risultati analisi proteomiche (ZooMS)	93
2. Teixoneres	98
2.1 Il sito	98
2.2 Insieme faunistico	99
2.3 Materiali analisi proteomiche	101
2.4 Risultati ZooMS	102
2.5 Risultati analisi LC-MS/MS	109
Conclusioni	110

<i>Amelogenina e determinazione del sesso</i>	118
Metodo di analisi dell'amelogenina estratta dallo smalto dentale	121
Applicazioni amelogenina:	122
○ <i>Stima del sesso nei non adulti</i>	122
1. Necropoli di Valdaro (MN)	122
1.1 Il sito	122
1.2 Materiali	123
1.3 Risultati	123
2. Arma Veirana (SV)	128
2.1 Il sito	128
2.2 Materiali	128
2.3 Risultati	129
3. Lazzaretto Vecchio di Venezia	130
3.1 Il sito	130
3.2 Materiali e metodi	130
3.3 Risultati	131
○ <i>Stima del sesso in individui da frammenti indeterminabili</i>	138
1. Necropoli di Vicenne e Morrione di Campochiaro (CB)	138
1.1 Il sito	138
1.2 Materiali	139
1.3 Risultati	139
2. Foz do Chapecó	142
2.1 Il sito	142
2.2 Materiali	143
2.3 Risultati	143
Conclusioni	144
Bibliografia	147

Introduzione

Studio delle proteine applicato all'archeologia

Lo studio delle proteine antiche può essere definito come l'identificazione delle proteine da materiale archeologico, storico e paleontologico. Sebbene le proteine provenienti da campioni di ossa fossili siano state analizzate per decenni, inizialmente mediante l'analisi della composizione degli amminoacidi (Abelson 1959; Jones e Vallentyne 1960), poi con approcci immunologici (Prager et al. 1980; Armstrong et al. 1983; Lowenstein e Ryder 1985) e infine con approcci basati sul sequenziamento (Huq et al. 1989), la prima applicazione dei metodi proteomici è avvenuta solo negli ultimi anni (Ostrom et al., 2000). Per paleoproteomica si intendono tutte le applicazioni dello studio delle proteine antiche combinate alla spettrometria di massa (Hendy et al., 2018a; Hendy, 2021).

I metodi per l'identificazione delle proteine antiche sono cambiati notevolmente con l'adozione di approcci basati sulla spettrometria. A differenza delle tecniche immunologiche, che si basano sulla rilevazione della presenza o assenza di particolari proteine bersaglio, la spettrometria di massa comporta la ionizzazione di molecole, delle quali vengono rilevate massa e carica con precisione. A differenza delle tecniche immunochimiche, questo significa che è possibile studiare proteomi antichi nella loro totalità invece che limitarsi alle proteine di nostro interesse. La disponibilità di strumenti in grado di fornire sempre maggiore risoluzione e precisione, ha aperto la strada al sequenziamento affidabile di proteomi antichi; infatti, nel 2012 è stato recuperato il primo proteoma osseo di un mammut risalente a circa 43 mila anni (Cappellini et al., 2012). Da allora, l'approccio è stato applicato con successo a una vasta gamma di resti animali, scale temporali e regioni geografiche, per chiarire una serie di questioni evolutive.

Le tecniche di spettrometria di massa si basano sull'analisi del peso molecolare del composto da analizzare. Questo metodo è molto semplice e inequivocabile perché il peso molecolare è una delle caratteristiche fondamentali e facilmente comprensibili di una molecola. Nello specifico, esistono due modi per analizzare le proteine con spettrometri di massa. Il primo, abbastanza raro, si basa sulla determinazione del peso molecolare di proteine integre. Un metodo invece più comune consiste nel digerire una catena polipeptidica con un enzima proteolitico specifico, solitamente la tripsina, che scinde i legami peptidici con elevata specificità dietro residui di arginina e lisina. Quindi, ogni proteina viene scissa in una serie di specifici frammenti di peptide con caratteristici pesi molecolari nell'intervallo di 700-4000 Da (Kuckova et al., 2019)

Il rilevamento della massa del peptide mediante MALDI-time-of-flight (ToF) è alla base della Zooarchaeology by Mass Spectrometry (ZooMS) (Buckley et al., 2009). Questa tecnica implica l'analisi di estratti peptidici con un MALDI-ToF che genera un'impronta digitale dell'estratto, costituita dal valore delle masse dei singoli peptidi. I valori ottenuti vengono poi confrontati con dei pesi teorici derivati da sequenze proteiche memorizzate in database che raccolgono tutti i peptidi specie specifici ottenuti da campioni noti. La tecnica ZooMS viene quindi utilizzata per identificare l'origine tassonomica di materiale storico e archeologico; il grado di specificità tassonomica è variabile e dipende dalla distanza evolutiva tra taxa. La proteina analizzata con questa tecnica è il collagene; una molecola formata da tre catene, due identiche e una geneticamente diversa ($\alpha 2$ (I)), e proprio le differenze nella sequenza proteica di questa catena, sono utili per la distinzione delle diverse specie. Questo metodo permette di distinguere taxa in molti casi al livello di genere/famiglia, quando esiste una divergenza di almeno 5 milioni di anni e anche al livello di specie per altre categorie di grandi mammiferi. Per le domande archeologiche, questa analisi non viene solo applicata a campioni ossei frammentati o morfologicamente non diagnostici, ma anche ad altri materiali come le pergamene (Kirby et al., 2013; Teasdale et al., 2017), l'avorio (Coutu et al., 2016), i gusci d'uovo (Stewart et al., 2013; Presslee et al., 2017) e oggetti in pelle (Ebsen et al., 2019).

La ZooMS è stata ampiamente applicata per identificare ed espandere il record faunistico riguardante le pratiche di allevamento, soprattutto per quei taxa che risultano molto simili a livello morfologico e che difficilmente possono essere distinti, come ad esempio pecore e capre (Zeder et al., 2010a; Zeder et al., 2010b). Ma è anche utilizzata in contesti paleolitici per ricostruire in maniera più esaustiva la composizione della fauna, dal momento che i resti risultano essere particolarmente frammentati e quindi difficilmente determinabili tassonomicamente tramite la sola analisi morfologica del frammento (Welker et al., 2015a; Welker et al., 2017; Sinet-Mathiot et al., 2019)

Attraverso l'analisi di altri substrati, la ZooMS può rivelare anche differenze temporali e geografiche nell'uso degli animali in epoca medievale (Kirby et al., 2013; Teasdale et al., 2017). Ad esempio, la pergamena può essere considerata come un archivio biomolecolare con indicazioni legate all'utilizzo di specifici animali, in base alla disponibilità delle varie specie in un contesto geografico e temporale. Riuscire a identificare delle preferenze nello sfruttamento degli animali in relazione al prodotto che si vuole ottenere, permette di comprendere meglio le peculiarità delle diverse culture.

Un'altra applicazione di questa tecnica è la ricostruzione della storia della conservazione e del restauro di un'opera d'arte. La ZooMS permette di analizzare la composizione di determinati strati di un dipinto e scoprire i trattamenti eseguiti sull'opera nel corso del tempo. In un dipinto di Ambrogio Lorenzetti (Mackie et al., 2018) ad esempio, tale tecnica ha permesso di individuare la presenza di materiali proteici applicati sulla superficie del dipinto, probabilmente durante diverse fasi di conservazione e restauro del bene.

L'estrazione e l'analisi del collagene contenuto nelle ossa lavorate e modificate dall'uomo, come ad esempio le punte d'osso ritrovate in un contesto Mesolitico nella zona del Doggerland, ha permesso di identificare a quale animale appartenessero (Dekker et al., 2021) e capire inoltre verso quali specie venisse indirizzata la caccia e lo sfruttamento da parte dell'uomo in quel contesto; lo stesso approccio è stato seguito anche per le punte d'osso maglemosiane ritrovate in Scandinavia (Jensen et al., 2020a).

La paleoproteomica può essere applicata anche agli oggetti organici utilizzati per confezionare beni materiali personali, come gioielli (Jensen et al., 2020b) e altre tipologie di ornamenti e vestiti. Questa tecnica è stata applicata anche a oggetti in pelle di epoca vichinga (Brandt & Mannering, 2021) per comprendere le tecniche di produzione, l'uso e la disponibilità di una specifica risorsa, il movimento degli oggetti e gli scambi culturali, ma anche comprendere se la scelta di un determinato taxon possa essere espressione del potere e del prestigio di una parte della società.

Oltre a questa tecnica, ha molte applicazioni e potenzialità anche la spettrometria di massa tramite cromatografia liquida (LC-MS/MS) che si basa sul sequenziamento delle proteine (o peptidi) contenute all'interno di un campione. L'analisi viene eseguita attraverso due o più fasi di frammentazione e la sequenza peptidica viene identificata attraverso la ricostruzione di frammenti di massa unici (Kuckova et al., 2018; Cleland & Schroeter, 2018). Questo approccio è stato applicato a una diversità di substrati e indagini archeologiche. Ad esempio, nell'ambito della ricostruzione delle pratiche culinarie e di ciò che veniva utilizzato come alimento in antichità, l'utilizzo dell'LC-MS/MS si è rivelato fondamentale. In quei contesti in cui le condizioni ambientali hanno permesso una buona conservazione della componente organica, le proteine sono state estratte direttamente da recipienti o da strumenti utilizzati nella preparazione dei cibi (Solazzo et al., 2008; Barker et al., 2012; Lucquin et al., 2016; Colonese et al., 2017; Hendy et al., 2018b), per poter analizzare nello specifico i loro costituenti. Queste tecniche vengono utilizzate non soltanto per rivelare i taxa degli animali e delle piante che venivano

consumati in passato, ma anche per studiare il processamento del cibo nelle diverse tecniche culinarie adottate. Ciò è possibile grazie al fatto che le proteine cambiano nel tipo e nell'abbondanza e subiscono delle modificazioni chimiche una volta sottoposte a differenti processi culinari (Yang et al., 2014).

Oltre questo approccio, la paleoproteomica è stata applicata allo studio del tartaro dentale, considerato un reservoir di informazioni legate al cibo consumato in passato. Di certo questo approccio ha dei limiti legati al fatto che non può andare a individuare tutta la varietà di cibi consumati da un determinato individuo, ma si limita soltanto a registrare quello che è presente all'interno del tartaro dentale. Ad esempio, Bleasdale et al. (2021) hanno analizzato il tartaro dentale di individui provenienti da diverse parti dell'Africa nord-orientale identificando delle proteine legate al latte, dimostrando che questo veniva consumato già sei millenni fa da gruppi di pastori. Inoltre, è stato possibile anche individuare da quale specie venisse ricavato il latte consumato. Questa applicazione permette di individuare i taxa utilizzati per questo scopo e di conseguenza comprenderne meglio il ruolo culturale e sociale nell'economia di queste popolazioni. Inoltre, può apportare ulteriori informazioni riguardo la dieta e lo stato di salute di un singolo individuo, sommandole agli indizi ricavati anche dallo studio osteologico e archeologico.

La paleoproteomica è molto importante anche per tutti quegli studi che riguardano la comprensione dell'evoluzione umana e animale, attraverso l'identificazione di polimorfismi a singolo amminoacido (SAPs) tra diverse specie, generando informazioni di tipo filogenetico. Esempi di questo approccio sono sicuramente gli studi portati avanti da Welker et al. (2016) e per lo studio di altre biomolecole, come quelle contenute nello smalto dentale, le ricerche di Cappellini et al. (2019).

I polimorfismi a singolo amminoacido (SAPs) sono originati da sostituzioni di nucleotidi nei geni che codificano per una determinata proteina e causano delle variazioni nella sequenza amminoacidica. Proprio questa variazione è ciò che rende più "semplici" le analisi filogenetiche. L'identificazione di resti di Neanderthal è avvenuta attraverso il riconoscimento di SAPs nella proteina COL10a1 (Welker et al., 2016). Allo stesso modo, l'individuazione di SAPs in COL1a2 ha permesso l'identificazione di resti di Denisoviani al di fuori del contesto di Grotta Denisova (Chen et al., 2019).

Diverse proteine non collagenose, come anche proteine di altri tessuti, sono state esplorate per comprendere se potessero essere utili negli studi filogenetici. Welker et al. (2019) hanno

analizzato le proteine all'interno dei denti di un *Gigantopithecus* e sono riusciti a rintracciare nello smalto 409 peptidi unici corrispondenti a 6 proteine. Queste, hanno permesso di collocare filologicamente in maniera più puntuale tale specie. Lo stesso approccio è stato applicato anche allo studio di taxa faunistici estinti come *Stephanorhinus* (Welker et al., 2017), *Macrauchenia* e *Toxodon* (Welker et al., 2015b e Buckley et al., 2015). Studi come questi dimostrano la potenzialità e la longevità di questo tipo di analisi.

La paleoproteomica può contribuire anche allo studio osteologico e paleopatologico attraverso l'identificazione delle proteine informative sulla fisiologia, i processi biologici e le malattie rintracciabili nei resti umani. La stima dell'età e del sesso, ad esempio, sono aspetti chiave nella ricostruzione del profilo biologico di un individuo. Recentemente, diversi studi si sono concentrati sull'analisi dell'amelogenina, una proteina che si trova all'interno dello smalto dentale. Il locus dell'amelogenina, infatti, presenta due geni omologhi, AMELX, localizzato sulla parte distale del braccio corto del cromosoma X e AMELY, situato vicino al centromero del cromosoma Y (Nakahori et al., 1991). La sequenza nucleotidica di questi due geni comporta la sintesi di peptidi con lievi differenze nelle sequenze amminoacidiche, che possono essere rilevate con lo spettrometro ed essere quindi utili nella determinazione del sesso, essendo gli individui femminili portatori di una coppia XX nei cromosomi sessuali, mentre quelli maschili di una coppia XY. Questo approccio è stato proposto per la prima volta da Nielsen-Marsh et al. nel 2009, ma successivamente anche da Stewart et al. (2017) e Parker et al. (2019) ed è stato applicato anche a contesti archeologici (Froment et al., 2020; Lugli et al., 2019; Belcastro et al., in review). Wasinger et al. (2019) hanno dimostrato la capacità di conservazione delle proteine e in particolare dell'amelogenina in contesti tropicali, mentre molti studi si sono concentrati su necropoli infantili o campioni di non adulti (Lugli et al., 2020; Rebay-Salisbury et al., 2020 e Gowland et al., 2021). Questo approccio consente di superare i limiti legati al campione archeologico come l'eccessiva frammentazione o la mancata conservazione di distretti scheletrici diagnostici, le difficoltà legate all'interpretazione e alla lettura di campioni osteologici patologici e l'impossibilità di ottenere questo dato da campioni di infanti o non adulti che non hanno ancora raggiunto la maturità scheletrica.

Sawafuji et al. (2017) e Procopio et al. (2018) hanno invece portato avanti studi sull'alpha-2-HS-glycoprotein notando una correlazione tra l'abbondanza di questa proteina e l'età biologica dell'individuo; all'aumentare dell'età, diminuisce la quantità della proteina.

Il proteoma contenuto nelle ossa è stato analizzato anche per comprendere i processi legati alle malattie. Le ossa archeologiche possono contenere delle proteine associate alle risposte immunitarie dell'individuo come quelle derivate da leucociti. L'analisi delle proteine antiche è stata applicata anche alle lesioni paleopatologiche; Bona et al. (2014) sono riusciti a identificare delle proteine che possono essere considerate dei biomarcatori in presenza di un tumore. Questi studi possono trovare applicazione anche nella scoperta di processi patologici in cui manca l'evidenza osteologica legata alla malattia.

ZooMS (Zooarchaeology by Mass Spectrometry)

La ZooMS è stata sviluppata come un metodo di screening per discriminare tessuti ricchi di collagene I dal punto di vista tassonomico (Buckley et al., 2009). Le prime proteine antiche ad essere studiate utilizzando metodi proteomici sono state estratte dalle ossa. L'osso è un materiale costituito per circa il 70% da una componente inorganica, per lo più idrossiapatite fosfato di calcio e una componente organica (per lo più proteine) rappresentata per la maggior parte da collagene. La presenza di cristalli di idrossiapatite, che incorporano e proteggono le proteine, contribuisce alla stabilità e alla conservazione delle ossa (Turner-Walker, 2008; Covington et al., 2010). Il collagene è la proteina strutturale più abbondante nel regno animale e degli oltre 27 tipi diversi di collagene, quello fibroso di tipo I è quello prevalente nelle ossa. Le proteine fibrose sono notevolmente insolubili in acqua a causa del gran numero di residui idrofobici nella struttura primaria, per questo il collagene si conserva abbastanza bene in ambiente di sepoltura (Buckley, 2018). Le altre proteine all'interno delle ossa sono definite "non collagenose" e svolgono svariate funzioni grazie alle loro proprietà biochimiche. La molecola del collagene I è lunga circa 300 nm e ha un diametro di 1,5 nm (Kadler et al., 1996) e anche se alcuni tipi di collagene sono omotrimeri, cioè formati da tre catene identiche, il collagene di tipo I è eterotrimerico, cioè nella maggior parte dei vertebrati è costituito da due catene identiche $\alpha 1$ (I) e una geneticamente distinta $\alpha 2$ (I). Ciascuna catena è avvolta alle altre attraverso una tripla elica e ognuna contiene 338 triplette di 3 soli amminoacidi ripetuti: glicina-prolina-idrossiprolina (G-X-Y). La glicina, in ogni terza posizione di ogni catena, è fondamentale per la ripiegatura delle tre catene nella loro caratteristica conformazione a tripla elica così stretta e compatta. L'assemblaggio del collagene di tipo I, II e III in fibrille è accompagnato dalla formazione di legami covalenti inter- e intramolecolari tra catene che conferiscono alta tensione, stabilità e resistenza meccanica alla fibrilla. Le sostituzioni non

sinonime nelle posizioni codificanti X e Y al livello di DNA sono di interesse per la ZooMS e per le analisi filogenetiche della sequenza proteica di COL1 perchè questa mutazione nucleotidica altera la sequenza amminoacidica della proteina. Variazioni in quelle specifiche posizioni possono diventare fisse durante gli eventi di speciazione e quindi hanno il potenziale per descrivere accuratamente le relazioni filogenetiche tra i membri del regno animale.

Questo metodo proteomico (ZooMS) è nato per analizzare le proteine che riuscivano a sopravvivere nei resti faunistici, primariamente per l'identificazione della specie. L'analisi delle proteine rispetto al DNA ha molti vantaggi:

1. le proteine sono molto più abbondanti
2. le proteine sopravvivono per molto più tempo e si degradano molto più lentamente rispetto al DNA (Demarchi et al., 2016) anche in ambienti temperati
3. le analisi possono essere portate avanti con costi molto ridotti
4. la quantità di materiale richiesto è molto limitata (<50 mg) e, sullo stesso frammento utilizzato per le analisi proteomiche, potenzialmente possono essere eseguite ulteriori analisi come quelle isotopiche
5. questo tipo di indagine, richiedendo una quantità di materiale molto limitata, può essere utilizzata come primo screening prima di procedere con analisi più costose e invasive (es. datazione ^{14}C o analisi genetiche)
6. non essendoci una parte di amplificazione, come nel caso del DNA (PCR), la possibilità di contaminazione è ridotta e, soprattutto, i danni legati alle proteine sono la prima evidenza della loro autenticità (van Doorn et al., 2012).

I primi metodi ZooMS prevedevano l'isolamento del telopeptide del collagene $\alpha 2(\text{I})$ utilizzando delle cartucce per estrazione in fase solida (SPE) seguito dalla digestione con una collagenasi batterica (Buckley et al., 2008); questi 18 peptidi però non erano sufficienti per separare la maggior parte degli animali addomesticati (es. per *Ovis aries* e *Capra hircus*). Successivamente, venne quindi sviluppato un metodo simile basato sempre su SPE, seguito però da una digestione con tripsina per isolare 33 amminoacidi dalla catena $\alpha 2(\text{I})$ che potevano discriminare tra di loro più taxa.

Per la fase di campionamento, sono sufficienti circa 50 mg di frammento osseo, oppure, per aumentare la superficie su cui andranno ad agire i vari step dell'estrazione, accrescendo la concentrazione di collagene che si riesce ad ottenere, il campione può anche essere

polverizzato. Nuovi approcci sempre più conservativi nei confronti del reperto, prevedono il campionamento e l'estrazione del collagene direttamente dalla busta di plastica in cui è conservato il frammento che si vuole studiare (Martisius et al., 2020), un metodo estremamente conservativo nei riguardi di reperti particolarmente importanti che non va ad intaccare la morfologia iniziale del frammento. Normalmente, quando si vuole adottare un approccio il più possibile conservativo nei confronti del campione, si procede con il protocollo che prevede soltanto la gelatinizzazione in ammonio bicarbonato (van Doorn et al., 2011) che non lascia tracce sull'osso; diversamente dal protocollo che prevede la demineralizzazione in HCl (Buckley et al., 2009) che inevitabilmente modifica la superficie dell'osso rimodellandola e arrotondandola.

Essenzialmente, il metodo ZooMS analizza le proteine delle ossa attraverso i peptidi che poi vengono misurati utilizzando la spettrometria di massa. Ci sono due approcci metodologici generali per ottenere un'impronta digitale del collagene tramite ZooMS. Uno è l'approccio più recente di decalcificazione dell'osso tramite un acido (solitamente acido cloridrico) e utilizzando l'ultrafiltrazione per trasferire la componente solubile in acido del collagene in un buffer compatibile per la digestione enzimatica (van der Sluis et al., 2014), mentre l'approccio più tradizionale, gelatinizza la componente insolubile in acido del collagene in un buffer che è compatibile con la conseguente digestione enzimatica e con l'analisi in spettrometria di massa. Entrambi gli approcci forniscono un risultato simile, ma ci sono comunque delle differenze: il primo, a volte permette di estrarre una maggiore quantità di collagene, ma può indurre deamidazione nei campioni analizzati (cioè passaggio da glutammina ad acido glutamico); il secondo, permette di evitare varie forme di contaminazione e non comporta pericoli di deamidare ulteriormente il campione (Ren et al., 2009; Hao et al., 2011; Simpson et al., 2016).

Dopo che le proteine solubilizzate sono state digerite (comunemente con la tripsina a una temperatura di 37 °C, la cui digestione viene portata avanti per circa 17 ore), la soluzione contenente i peptidi viene acidificata utilizzando acido formico e concentrata e purificata grazie all'utilizzo di SPE. A questo punto i campioni sono pronti per essere caricati sulla piastra di uno spettrometro e quindi analizzati. Nello spettrometro MALDI, i campioni vengono appunto 'spottati' su una piastra e co-cristallizzati con una matrice che assorbe la luce, solitamente l'acido α -ciano-idrossicinnamico, utilizzato per misurare peptidi e piccole proteine (<20 kDa) (Kuckova et al., 2018). Il campione viene poi irradiato dal laser attraverso il quale gli analiti sublimano e vengono diretti verso l'analizzatore di massa. Misurando il tempo impiegato da ogni analita (ioni di peptidi) per attraversare il tubo di volo (a una distanza nota), il suo range

massa/carica (m/z) può essere dedotto in base all'energia di ingresso nota; gli analiti più grandi impiegheranno più tempo per percorrere il tragitto, mentre quelli più piccoli saranno più veloci. Quando si verifica una sostituzione di amminoacidi all'interno dei peptidi osservati, quindi una differenza tra taxa, questo cambiamento sarà visualizzato come una differenza nei picchi m/z all'interno dell'impronta digitale acquisita. Una volta ottenuto lo spettro e l'elenco dei peptidi presenti all'interno del campione analizzato, questi vengono confrontati con dei database di riferimento che raccolgono tutti i peptidi specie specifici ottenuti da campioni noti, detti anche markers peptidici. Confrontando le informazioni sulla sequenza genomica, sono stati individuati alcuni peptidi (Buckley et al., 2009; Welker et al., 2016) ritenuti abbastanza variabili da permettere la distinzione di diverse specie di mammiferi (tabella 1).

Nel campo archeozoologico, la ZooMS può essere utilizzata per aumentare il numero di esemplari identificati a livello di specie (NISP= Number of Identified Specimens), ma non può essere utilizzata per aumentare il numero minimo degli individui all'interno di un determinato contesto, perché per lo più si tratta di frammenti morfologicamente indeterminati che sarebbero impossibili da collocare da un punto di vista anatomico. Nel caso in cui si attesti tramite questo metodo, la presenza di un taxon non documentato dalle analisi archeozoologiche tradizionali, il dato dovrà essere preso con cautela e semmai verificato attraverso altre successive analisi come quelle in LC-MS/MS o quelle genetiche (procedimento adottato anche quando si registra la presenza di un frammento umano all'interno del record faunistico).

Anche la ZooMS è una tecnica non esente da limiti. Poiché gli approcci di spettrometria di massa singoli non sono in grado di fornire dati sulle sequenze primarie dei peptidi che rilevano, gli studi di peptide mass fingerprinting presentano alcune limitazioni. Per esempio, sono generalmente in grado di determinare la tassonomia di un determinato campione per lo più al livello sopra specifico, non a livello della specie. Questo perché taxa strettamente imparentate, non hanno avuto tempo sufficiente affinché la sequenza del loro collagene I riuscisse a divergere fino al grado che permette di fornire informazioni al livello della specie. Inoltre, perché all'interno dei campioni tutti i peptidi vengono ionizzati insieme, i peptidi meno abbondanti o quelli con minore efficacia di ionizzazione non potranno essere rilevati. Per le ossa, questo limita la maggior parte delle identificazioni tassonomiche al collagene I, indipendentemente dal fatto che vi siano proteine aggiuntive conservate nel campione (Cleland & Schroeter, 2018).

Peptide Markers																							
Specie	P1	Q	A	sequenza	Q	A'	B	sequenza	C	sequenza	P2	D	sequenza	QQ	E	sequenza	F	sequenza	F'	Q	G	sequenza	G'
<i>Loxodonta africana</i>	1079,6	1145,6		PGHAGAVGPAGVR	1161,6						1556,7				2808,4	GEQGPAGPPGFQGLPSPGTAGEAGKPGER	2853,5	GLTGPiGPPGAPAGDKGEAGPSGPAGPTGAR	2869,4	3015,3		GSSGEOGTAGPPGTPGQGLLGPGLLPGSR	3015,5
<i>Sus scrofa</i>	1105,6	1180,6		TGQBGAVGPAGIR	1196,6		1437,7 1453,7	GIOGEFGLOGBAGPR	1550,8	GPOGESGAAGPAGPIGSR	1647,8	2131,1	GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	2820,4	GEQGPAGPPGFQGLPSPGTAGEVKGKPGER	2883,5	GLTGPiGPPGAPAGDKGETGSPGAGPTGAR	2899,4	3033,4		GPSGEOGTAGPPGTPGQGLLGPGLLPGSR	3033,5	
<i>Ovis aries</i>	1105,6	1180,6		TGQBGAVGPAGIR	1196,6		1427,7 1443,7	GIOGEFGLOGBAGAR	1580,8	GPOGESGAAGPTGPIGSR		2131,1	GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	2792,4	GEQGPAGPPGFQGLPSPGTAGEAGKPGER	2853,5	GLTGPiGPPGAPAGDKGEAGPSGPAGPTGAR	2899,4	3033,4		GPSGEOGTAGPPGTPGQGLLGPGLLPGSR	3033,5	
<i>Bos taurus</i>	1105,6				1208,7		1427,7	GIOGEFGLOGBAGAR	1580,8	GPOGESGAAGPTGPIGSR	1648,8	2131,1	GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	2792,4	GEQGPAGPPGFQGLPSPGTAGEAGKPGER	2853,5	GLTGPiGPPGAPAGDKGEAGPSGPAGPTGAR	2869,4	3033,4		GPSGEOGTAGPPGTPGQGLLGPGLLPGSR	3033,5	
<i>Equus caballus</i>	1105,6	1182,6		SGQBGTVPAGVR	1198,6		1427,7	GIOGEFGLOGBAGAR	1550,8	GPOGESGAAGPAGPIGSR	1649,8	2145,1	GLPGVAGSLGEPGLGIAGPPGAR	2820,4	GEQGPAGPPGFQGLPSPGTAGEVKGKPGER	2883,5	GLTGPiGPPGAPAGDKGETGSPGAGPTGAR	2899,4	2999,3		GPSGEOGTAGPPGTPGQGLLGPGLLPGSR	2999,5	
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1105,6	1205,6		SGHBGTVPAGLR	1237,6		1453,7 1469,7	GIOGEFGLOGBAGPR	1550,8	GPOGESGAAGPAGPIGSR		2129,1	GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR			2883,5	GLTGPiGPPGAPAGDKGETGSPGAGPTGAR	2899,4	2957,3		GPSGEOGTAGPPGTPGQGLLGPGLLPGSR	2973,5	
<i>Felis sylvestris</i>	1105,6	1207,6		IGQBGSVGPAGVR	1223,6		1453,7 1469,7	GIOGEFGLOGBAGPR			1609,8	2163,1	GLPGVAGSVGEPGLGISGPPGAR			2853,5	GLTGPiGPPGAPAGDKGEAGPSGPAGPTGAR	2869,4	2999,3		GPSGEOGTAGPPGTPGQGLLGPGLLPGSR	2999,5	
<i>Canis lupus</i>	1105,6	1210,6		IGQBGTVPAGIR	1226,7		1453,7 1469,7	GIOGEFGLOGBAGPR	1566,8	GPOGESGAAGPSGPIGSR	1649,8	2131,1	GLPGVAGSVGEPGLGIAGPPGAR	2820,4	GEQGPAGPPGFQGLPSPGTAGEVKGKPGER	2853,5	GLTGPiGPPGAPAGDKGEAGPSGPAGPTGAR	2869,4	2999,3		GPSGEOGTAGPPGTPGQGLLGPGLLPGSR	2999,5	
<i>Homo sapiens</i>	1105,6	1219,6		IGHBGTVPAGIR	1235,6		1477,7 1493,7	GLHGEFGLOGBAGPR	1580,8	GPOGESGAAGPTGPIGSR	1619,8	2115,1	GLPGVAGAVGEPGLGIAGPPGAR	2832,4	GEQGPAGPPGFQGLPSPGAGEVKGKPGER	2869,5	GLTGPiGPPGAPAGDKGESGPSGPAGPTGAR	2885,4	2957,3		GPSGEOGTAGPPGTPGQGLLGPGLLPGSR	2973,5	

Tabella 1: Alcuni marcatori peptidici relativi ad alcune specie presenti all'interno dei siti archeologici presi in esame con le rispettive sequenze amminoacidiche. I peptidi con indicato l'apice (es. A', F' e G') sono gli stessi peptidi (A, F, G) ma con una prolina idrossilata in più. Con la lettera Q sono stati indicati i peptidi che possono subire deamidazione, quindi uno spostamento della massa pari a +0.984 Da.

Conseguenze della diagenesi sulle analisi di spettrometria di massa

Le interazioni geochimiche delle ossa con l'ambiente durante la sepoltura/fossilizzazione possono produrre una varietà di alterazioni diagenetiche nel tessuto, molte delle quali sono ancora poco comprese. Nel caso dei biominerali, avvengono dei processi diagenetici che portano alla trasformazione sia della componente minerale che di quella organica ed è importante ricordare che queste due non possono verificarsi in maniera indipendente. Il collasso della fase inorganica influenza il modo in cui la componente organica si andrà a degradare (o a preservare) e viceversa (Demarchi, 2020). Questi cambiamenti possono esprimersi a vari livelli, da quello macroscopico, quindi ad esempio come una deformazione osteologica, ad alterazioni della sequenza molecolare, che risulta in PTMs (Post-translational modifications) che sono in questo caso di origine diagenetica e non biologica. Durante la diagenesi, tutte le variazioni a livello chimico che avvengono all'interno dell'osso, possono potenzialmente comportare una situazione per cui una proteina può essere rilevata in un'area dell'osso e non in un'altra. Inoltre, come le condizioni geochimiche all'interno di un ambiente di sepoltura possono variare entro pochi centimetri, questo effetto spaziale può essere amplificato attraverso più di un metro di sedimento, comportando delle differenziazioni notevoli nel livello di conservazione o di degradazione di campioni di grandi dimensioni o tra ossa che si trovano in una stessa area dello scavo (Cleland & Schroeter, 2018).

Alcuni esempi di queste modificazioni post traduzionali possono essere l'ossidazione, la deamidazione, la carbamilazione, l'amidazione ecc. La deamidazione dei residui di glutammina e asparagina è una comune modifica non enzimatica che si traduce nella trasformazione di questi in acido glutamico e acido aspartico con uno spostamento di massa di +0,98402 Da causato dalla conversione di una catena laterale del gruppo ammidico con un carbossilato attraverso un intermediario ciclico (glutarimmide/succinimmide) in condizioni alcaline e neutre (o in presenza di specie cationiche metalliche) (Schroeter & Cleland, 2016). Le percentuali normali di deamidazione per i singoli residui, se mantenuti a condizioni ambientali costanti, hanno portato i ricercatori a ipotizzare che la deamidazione funzioni come un orologio molecolare per i processi biologici in vivo, quali l'invecchiamento e lo sviluppo (Robinson & Robinson, 2001a; Robinson & Robinson, 2001b). Poiché il tasso di turnover dei residui di glutamminile è più lento di quello dell'asparaginile, la deamidazione della glutammina può essere utile come strumento per lo studio dei processi non biologici al di fuori dei tessuti viventi, come l'invecchiamento degli artefatti storici (ad esempio, opere d'arte che utilizzano pitture proteiche) (Wilson et al., 2012). La deamidazione post-mortem dei residui di glutammina nei

peptidi del collagene I è stata utilizzata per studiare la degradazione delle proteine nei resti archeologici. Conseguentemente, un'estensiva deamidazione della glutammina è stata invocata come conferma dell'autenticità dei peptidi del collagene recuperati dal fossile (Welker et al., 2015). Tuttavia, questo uso della deamidazione come proxy per l'età è frutto di evidenze solo empiriche e preclude la possibilità che le proteine possano essere sia ben conservate che antiche. Sono molti i fattori che influenzano la diagenesi, questi coinvolgono sia le caratteristiche proprie del campione, come la composizione chimica della matrice organica, ma anche molte condizioni ambientali alle quali sono sottoposte le proteine durante questo processo. Possono influenzare il tasso e il livello totale di deamidazione osservabile in un campione il pH del suolo, la forza ionica e la presenza di ioni tampone, l'effetto combinato del trascorrere del tempo e della temperatura. L'entità del danno provocato dalla deamidazione è difficile da predire, perché dipende da molti elementi quali l'altitudine, la profondità di sepoltura, il tipo di suolo, la presenza o assenza di vegetazione, l'esposizione diretta al sole, l'erosione ecc (Wehmiller, 1977; Miller et al., 1992; Collins & Demarchi, 2015).

Queste condizioni sono molto variabili quando si tratta di contesti archeologici e possono cambiare molto anche su scala locale causando differenze nel livello di deamidazione tra singole ossa in uno stesso ambiente, ma anche tra aree diverse di uno stesso frammento osseo. Studi come quello di Wilson et al. (2012) e di van Doorn et al. (2012), hanno messo in luce che i pattern di deamidazione di specifici peptidi variano molto: alcuni peptidi sembrano deamidare sempre in ogni campione, altri mai. Questo suggerisce che specifici peptidi del collagene possono essere più utili per comparare il livello di deamidazione tra campioni rispetto ad altri, ma fa comprendere anche le potenziali difficoltà che si potrebbero incontrare nell'applicare questo metodo a campioni di fossili molto differenti tra di loro per età e specie. Ad esempio, in Welker et al. (2017), gli autori hanno selezionato il peptide P1105 per valutare il livello di deamidazione dei campioni perché possiede una sequenza amminoacidica primaria identica tra le diverse specie prese in considerazione nello studio, eliminando così un potenziale fattore di disturbo nel calcolo della deamidazione della glutammina (Robinson & Robinson, 2001b; Robinson et al., 2002). Schroeter et al. (2016) ritengono che proprio a causa delle variabili che giocano un ruolo molto importante nel calcolo della percentuale di deamidazione in campo archeologico, invocare questo parametro come prova di endogenità o di autenticità dell'antichità del dato proteomico, sia inappropriato. Per questo suggeriscono di considerarlo piuttosto come un marcatore della qualità di preservazione del campione che come criterio per determinare la sua posizione cronologica. Infatti, alcuni studi evidenziano che la ritenzione di

ammidi può essere un indicatore della buona conservazione della proteina nelle sue componenti strutturali (Robinson & Robinson, 2001a; Robinson, 2004). In generale, possiamo considerare il livello della deamidazione della glutammina come un'indicazione riguardo la storia diagenetica dell'osso, ma proprio per determinare accuratamente la sua estensione, è importante minimizzare le condizioni che potrebbero indurre la deamidazione durante la preparazione del campione (Simpson et al., 2016).

È stato dimostrato che alcuni protocolli di estrazione del collagene possono indurre deamidazione, in particolare quelli che prevedono una fase di demineralizzazione in HCl (Ren et al., 2009; Hao et al., 2011; Simpson et al., 2016). Per evitare di aumentare quindi il livello di deamidazione nei campioni da analizzare, in questo studio si è sempre tentato inizialmente di utilizzare il protocollo van Doorn et al., 2011 che prevede solo una fase di gelatinizzazione con ammonio bicarbonato. Approccio utilizzato anche in vista del calcolo del tasso di deamidazione dei campioni (Welker et al., 2017; van Doorn et al., 2012).

Utilizzo della ZooMS in contesti di transizione tra Paleolitico medio e superiore

La fase della transizione tra Paleolitico medio e superiore nell'Europa occidentale riguarda lo stadio isotopico 3, durante il quale si verificarono una serie di significativi cambiamenti nel comportamento umano, rispecchiati dalla comparsa nel record archeologico di moltissimi tecnocomplessi (il Castelperroniano al centro e nella zona sud-occidentale della Francia e nel nord della Spagna, l'Uluzziano in Italia e in Grecia, il Neroniano nella zona sud-orientale della Francia, lo Szeletiano in Repubblica Ceca e Slovacchia, l'industria Bohuniciana nell'Europa Centrale e il Lincombiano-Ranisiano-Jerzmanowiciano nel nord Europa) che sostituirono le preesistenti culture materiali Musteriane (Hublin, 2015). Questo momento ha un ruolo cruciale nella discussione sullo sviluppo e la diffusione del comportamento moderno e per comprendere i tempi e le cause dell'estinzione dei Neanderthal (Higham et al., 2014). Ad oggi esistono diverse posizioni sulle dinamiche che hanno caratterizzato questa delicata fase della nostra storia: alcuni studiosi (Mellars, 2005) ritengono che la comparsa di marcate espressioni del comportamento umano moderno in Europa siano avvenute in concomitanza con la comparsa e dispersione di *Homo sapiens* (HS). Tale comportamento sarebbe caratterizzato dallo sfruttamento di un'ampia gamma di risorse faunistiche (sia marine che terrestri), ma anche vegetali, come anche dalla produzione di strumenti litici tipici come le armi da getto (Sano et al., 2019), bacini più ampi per l'approvvigionamento di materie prime per la produzione di

strumenti litici, comparsa di differenti forme di simbolismo, di arte e musica, l'uso sistematico di ornamenti, pigmenti e di strumenti in osso. Altri studiosi suggeriscono invece che parte di queste innovazioni culturali fossero già state acquisite indipendentemente dai Neanderthal e che HS fosse arrivato in Europa dopo la scomparsa dei predecessori (d'Errico et al., 1998; Zilhao, 2007; Romandini et al., 2014) o che particolari oggetti e strumenti innovativi fossero stati prodotti dai Neanderthal in seguito ad una trasmissione culturale da parte dei *sapiens* (Hublin et al., 2012).

È evidente che l'origine e il significato dei cambiamenti culturali e delle interazioni biologiche tra HS e Neanderthal non sono ancora state comprese a pieno e perciò sono ancora di grande interesse per paleoantropologi e archeologi.

Il dibattito scientifico si focalizza su alcune questioni che devono essere ancora chiarite e risolte: Sapiens e Neandethal hanno coesistito e interagito in Europa? L'arrivo dei *sapiens* coincide con la transizione tra Paleolitico medio e superiore in termini di cultura materiale? I *sapiens* hanno occupato le stesse aree che precedentemente erano state abitate dai Neanderthal? Il successo di HS si deve a delle qualità e abilità intrinseche che hanno favorito la sua migrazione e il suo adattamento? La migrazione dei *sapiens* in Europa è stata promossa da un miglioramento delle condizioni climatiche? (Benazzi et al., 2020).

Moltissimi fattori contribuiscono a rendere ancora incerti i tempi e i modi della prima migrazione dei *sapiens* in Europa e la scomparsa dei Neanderthal:

- soltanto pochissimi siti archeologici che registrano nella loro stratigrafia la Transizione tra Paleolitico medio e superiore sono stati accuratamente indagati o sono ben documentati e precisamente datati (Dinnis et al., 2019; Highman et al., 2011, 2012)
- vi è una generale mancanza di confronto su larga scala delle informazioni ottenute da depositi datati alla Transizione (es. metodi di produzione litica, strategie di approvvigionamento delle materie prime, strategie di sfruttamento della fauna)
- i resti umani datati tra 50 mila e 35 mila anni fa sono documentati soltanto in un numero molto ristretto di siti europei e molto spesso sono dei fossili molto frammentati che non consentono di ottenere un'attribuzione tassonomica certa (Hublin, 2015; Gravina et al., 2018; Zilhao et al., 2015; Talamo et al., 2016a; Moroni et al., 2018).

All'interno di questo dibattito, l'Europa Mediterranea e in particolare l'Italia, gioca un ruolo fondamentale nello studio e nella comprensione di questo periodo, per una serie di motivi legati alla sua posizione geografica e alla variabilità ecologica, alla presenza di siti archeologici chiave

datati alla Transizione, la presenza di diversi tecnocomplessi come il Musteriano, l'Uluzziano e il Protaurignaziano associati a resti fossili umani (Benazzi et al., 2011; Benazzi et al., 2015). Relativamente all'Europa Mediterranea, i Neanderthal sono associati a litica musteriana mentre i Sapiens a tecno-complessi uluzziani e protoaurignaziani. L'Uluzziano, dal punto di vista della tecnologia litica è caratterizzato da una sua propria originalità e coerenza (Riel-Salvatore, 2009, 2010; De Stefani et al., 2012; Moroni et al., 2013, 2018; Ronchitelli et al., 2018; Villa et al., 2018; Peresani et al., 2019; Arrighi et al., 2020a) con una produzione di manufatti in osso (d'Errico et al., 2012; Peresani et al., 2016; Villa et al., 2018; Peresani et al., 2019; Arrighi et al., 2020a) e ornamenti (Arrighi et al., 2020b, 2020c). Dal punto di vista tecnologico, la produzione litica uluzziana è caratterizzata da una gestione meno attenta delle prime fasi del débitage, ottenendo principalmente morfologie di utensili mediante ritocco (Marciani et al. 2020). Il concetto di débitage utilizzato è semplice ed è attestato l'utilizzo sia di percussione diretta a mano libera che di tecnica bipolare su incudine nella stessa sequenza di riduzione (Collina et al., 2020).

I dati archeozoologici relativi a questa fase, suggeriscono che le strategie di adattamento umano hanno subito un cambiamento nel corso del tempo per far fronte alle variazioni delle condizioni ecologiche e topografiche, ma anche per affrontare le incertezze nella disponibilità delle risorse (Romandini et al., 2020). Nella zona meridionale dell'Italia si nota un marcato cambiamento nello sfruttamento degli ungulati tra tardo Musteriano e l'inizio del Paleolitico superiore (Boscato & Crezzini, 2012; Romandini et al., 2020), mentre nell'Italia settentrionale una maggiore varietà di tecniche di processamento degli animali era già presente dal tardo Musteriano (Romandini et al., 2020).

Per l'importanza che riveste questo momento e questo particolare tecnocomplesso e per i dubbi che devono ancora essere chiariti riguardo l'Uluzziano, quattro dei cinque contesti presi in esame con la tecnica della ZooMS, datano proprio al momento della Transizione tra Paleolitico medio e superiore. Lo scopo è quello di ottenere ulteriori dati che possano meglio chiarire la cultura Uluzziana, lo sfruttamento delle risorse di gruppi umani uluzziani e dirimere le controversie circa gli artefici di questo tecnocomplesso.

Scopi e obiettivi:

In questo progetto sono stati presi in considerazione diversi contesti sia in termini di collocazione geografica che temporale, ai quali di volta in volta sono state applicate delle tecniche per ottenere informazioni tassonomiche (nel caso della ZooMS) e informazioni legate alla stima del sesso dell'individuo (nel caso dell'analisi dell'amelogenina).

Il progetto ha previsto anche l'organizzazione e l'impostazione iniziale di un laboratorio adibito alle analisi proteomiche poichè questo non era presente al Dipartimento di Beni Culturali di Ravenna. Mi sono occupata personalmente della scelta dei materiali e delle strumentazioni al fine di poter procedere con le analisi (cappa a flusso laminare verticale, termomixer, centrifuga e bagno a ultrasuoni). Nel corso dei tre anni del progetto di dottorato, ho cercato di ottimizzare i vari protocolli utilizzati per l'estrazione delle proteine. Inizialmente venivano utilizzate per la purificazione e concentrazione dei peptidi nell'ultima fase del protocollo, ZipTip® (Merck) e HyperSep SpinTip® (Thermo Scientific), che hanno un costo molto elevato e non erano funzionali alle grandi quantità di campioni analizzati per ogni sito. Di conseguenza, dopo aver partecipato alla Practical Palaeoproteomics Summer School 2020 dell'Università di Copenaghen, ho appreso come costruire stage tips in-house, assemblandole prima di ogni estrazione, tramite dischi di resina C₁₈ (Empore™ SPE Disks). L'utilizzo di queste stage tips ha permesso di abbattere notevolmente i costi e di non essere più legati ad un numero prestabilito e limitato di ZipTip e SpinTip.

Attualmente, la fase di campionamento ed estrazione delle proteine avviene al Dipartimento di Beni Culturali di Ravenna mentre per la fase di analisi spettrometrica per quanto riguarda la ZooMS e quindi analisi in MALDI-ToF, i campioni vengono spediti presso il laboratorio del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Salerno, mentre per le analisi in LC-MS/MS presso il Centro Interdipartimentale Grandi Strumenti dell'Università di Modena e Reggio Emilia.

In particolare, mi sono concentrata su due linee di ricerca diverse:

da una parte, l'applicazione della ZooMS in contesti paleolitici con due diversi obiettivi:

- combinare lo studio del collagene all'archeozoologia per ottenere un quadro più completo del contesto preso in esame, attraverso i dati sulla composizione della fauna e sul suo sfruttamento attuato dall'uomo
- utilizzare la ZooMS come strumento di pre-screening e di selezione di campioni per ulteriori analisi biomolecolari (es. LC-MS/MS o analisi genetiche). Trattandosi per lo

più di contesti di transizione, questo approccio è stato applicato per individuare la presenza di frammenti umani all'interno del record osteologico preso in esame, con l'intento di ottenere nuovi dati.

dall'altra, l'estrazione e l'analisi dell'amelogenina dallo smalto dentale di diversi campioni umani ha permesso di ottenere le informazioni legate al sesso degli individui analizzati, quando altri tipi di analisi come l'approccio osteologico, non permettevano di ottenerle.

I campioni umani presi in esame possono essere ricondotti a due tipi di problematiche:

- campioni di non adulti per i quali risulta difficile la stima del sesso perché sono individui che non hanno raggiunto la maturità scheletrica
- campioni molto frammentati che non conservano i distretti diagnostici per la determinazione del sesso.

Metodi

Analisi archeozoologiche e tafonomiche

Tutto il materiale osteologico è stato analizzato all'interno del laboratorio di Osteoarcheologia e Paleoantropologia (Bones Lab) del Dipartimento di Beni Culturali di Ravenna. La determinazione tassonomica è avvenuta servendosi di due collezioni di confronto, quella presente nel Bones Lab e quella dell'Università di Ferrara conservata presso la sezione di Scienze Preistoriche e Antropologiche del Dipartimento di Studi Umanistici, oltre che grazie alla consultazione di manuali.

Ogni singolo frammento è stato analizzato macroscopicamente tentando di identificare la specie e l'elemento anatomico, dove l'evidenza era consistente e dove le dimensioni e la conservazione lo permettevano, ma anche per rilevare la presenza di note tafonomiche (ove possibile distinguendole a occhio nudo o con lenti d'ingrandimento) di origine naturale (manganese, radici, weathering ecc.), antropiche (tracce di macellazione, combustione, calcinazione ecc.) e animali (tracce di carnivori e rosicchiature). Per accertarsi di aver individuato la giusta nota tafonomica, il pezzo è stato esaminato anche microscopicamente con l'aiuto del microscopio LeicaS9i.

Nel contempo, sono stati effettuati i conteggi dei frammenti suddivisi per dimensioni (in cm da 0,3 a 1; da 1 a 2; da 2 a 3; da 3 a 4; da 4 a 5 e > di 5), accorpando quelli di una stessa dimensione

e elemento anatomico, solo nel caso in cui fossero indeterminati e/o presentassero le stesse indicazioni tafonomiche di origine naturale o più di una di esse. Per tutti i reperti superiori ai 3 cm di lunghezza, e/o di rilevante interesse ai fini dello studio (tafonomico, tracce antropiche, determinati, e/o determinabili da un punto di vista anatomico e/o paleontologico), si sono misurate anche larghezza (LA 0,3-1 cm; 1-2 cm; 2-3 cm; 3-4 cm; 4-5 cm; >5 cm) e spessore (S 0,3-1 cm; 1-2 cm; 2-3 cm; 3-4 cm; 4-5 cm; >5 cm). A tutti questi reperti è stato assegnato un numero di studio progressivo accompagnato da una sigla rifacente al sito.

Analisi proteomiche (ZooMS)

Tutti i frammenti ossei che sono risultati indeterminati dal punto di vista tassonomico sono stati ricontrollati per poi essere selezionati per le analisi proteomiche. La selezione è avvenuta tenendo in considerazione alcuni criteri:

1. Dimensioni superiori ai 2 cm del frammento
2. Presenza e disposizione delle trabecole all'interno del frammento osseo
3. Presenza lieve di note tafonomiche come combustione, manganese o concrezione
4. Posizione del frammento al momento del ritrovamento sullo scavo, in termini di areale
5. Spessore, densità e porosità dell'osso corticale

Dopo aver scelto i campioni da analizzare, ogni singolo frammento osseo è stato documentato grazie all'utilizzo di una macchina fotografica, si è poi proceduto al campionamento con un trapano Dremel. Si è preferito campionare un frammento di osso (~10-30 mg) piuttosto che polverizzarlo. Il campionamento è avvenuto nella massima attenzione, in particolare decontaminando la lama del trapano ad ogni campione tramite candeggina e poi etanolo e con l'utilizzo di guanti sterili per evitare forme di contaminazione da parte dell'operatore.

Il protocollo utilizzato per i campioni provenienti dai siti di Uluzzo C, Riparo del Broion, Grotta del Cavallo e Teixoneres, tutti caratterizzati da uno strato molto spesso di concrezione sulla superficie, è quello di Buckley et al., 2009, che prevede una fase iniziale di decalcificazione del campione in HCl 0.6 M lasciato agire per circa 24 ore. Soltanto per il sito di Rocca San Sebastiano, i cui campioni si presentavano poco compromessi dal punto di vista tafonomico, la fase di demineralizzazione non è stata eseguita, passando direttamente alla fase di

gelatinizzazione in ammonio bicarbonato (van Doorn, 2011). Vengono quindi aggiunti 300 μ l di Ambic 50 mM per 3 h a 65°, per estrarre la porzione del collagene osseo insolubile in acido. Dopo essere stati centrifugati, vengono prelevati 50 μ l di surnatante per ogni campione e trasferiti in una nuova Eppendorf. In ogni campione vengono aggiunti 0,5 μ l di tripsina (Mass Spectrometry Grade; Promega) che viene lasciata agire per circa 17 h a 37°. La digestione viene poi stoppata aggiungendo 5 μ l di acido formico al 5%. A questo punto, inizia la fase di concentrazione e purificazione dei campioni tramite C₁₈ ZipTip (Thermo Scientific Pierce™) utilizzate per i campioni provenienti dai contesti di Uluzzo C, Grotta del Cavallo e Teixoneres e tramite stage tips in-house per i campioni provenienti da Roccia San Sebastiano e Riparo del Broion. Si tratta in entrambi i casi di puntali all'interno dei quali si trova una resina (C₁₈) in grado di trattenere i peptidi del collagene che verranno poi analizzati con lo spettrometro di massa MALDI-ToF. Quest'ultima fase prevede il susseguirsi di una serie di step:

- Condizionamento: i puntali vengono trattati con acido formico (FA) allo 0.1% e acetonitrile (ACN) al 100%.
- Caricamento del campione nei puntali per far sì che i peptidi vengano trattenuti dalla resina
- Lavaggio della resina con acido formico 0.1%
- Eluizione dei peptidi intrappolati nella resina con una soluzione di 50% ACN in 0.1% FA.

I campioni vengono poi seccati sotto una cappa a flusso laminare verticale per alcune ore. Dopo la risospensione, ogni campione (1 μ l) viene spottato su una piastra e mixato con 1 μ l di α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA; Sigma) come matrice. I campioni vengono poi analizzati con un MALDI-ToF (Bruker) con range massa su carica di 700-3500 *m/z*.

Una volta ottenuti gli spettri, i campioni vengono ispezionati manualmente utilizzando mMass (Strohalm et al., 2010), dopo aver impostato un signal-to-noise ratio pari a 3.5 e la correzione della baseline con parametri di default (Baseline correction precision 100 e relative offset 0; smoothing method Savitzky-Golay algorithm, window size 0.2 *m/z* e 1.5 cycles; peak picking con deisotoping tool, relative intensity threshold 0.5% and picking height 80%) (Wang et al., 2021). L'attribuzione tassonomica infine viene effettuata confrontando i peptidi identificati con un database di marcatori peptidici per tutti i mammiferi europei di medie e grandi dimensioni (pubblicato da Welker et al., 2016).

Applicazioni ZooMS:

Combinare la ZooMS all'archeozoologia

1. Uluzzo C

1.1 Il sito e gli scavi archeologici

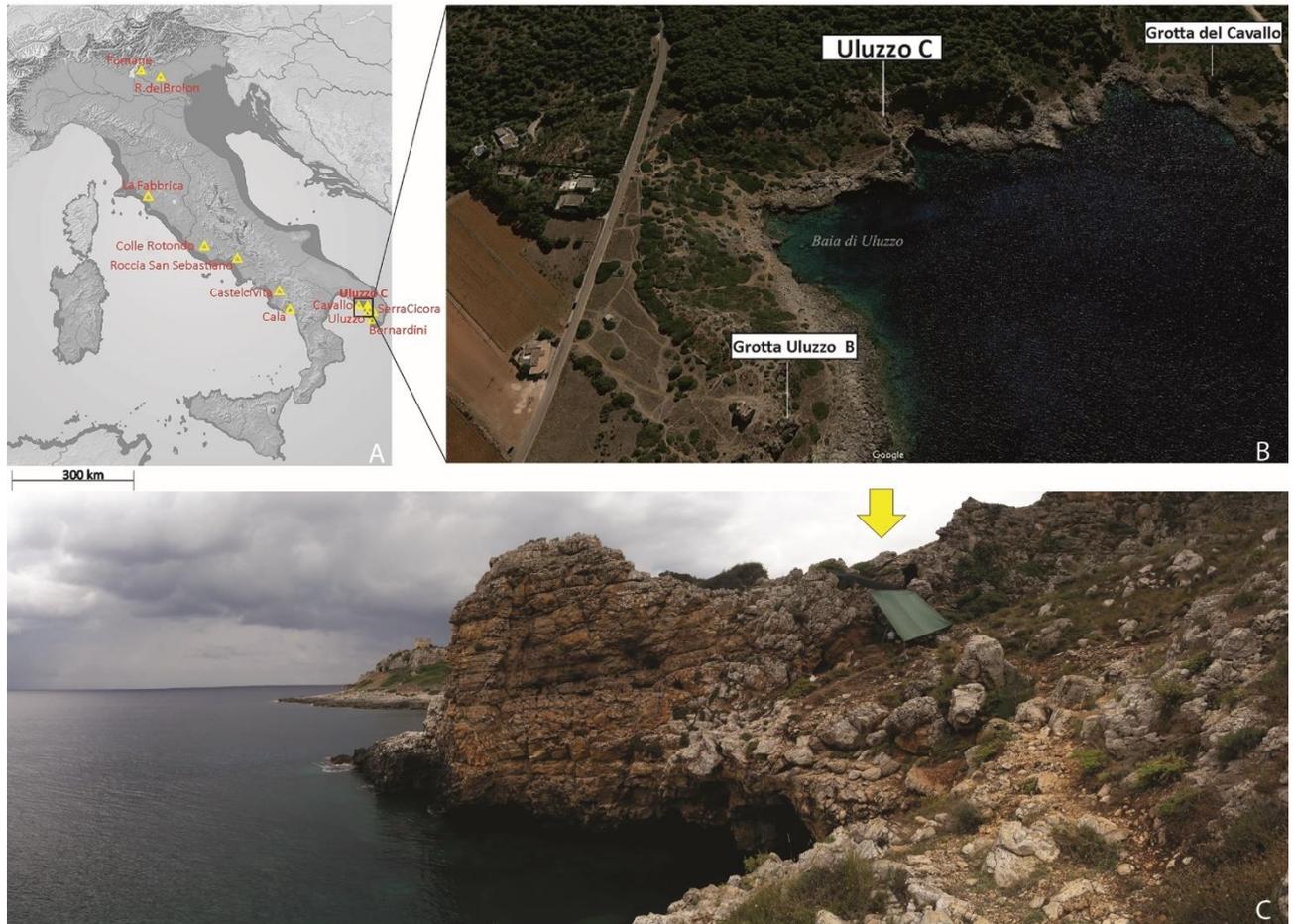


Figura 1. A. Siti uluzziani in Italia. B. Geolocalizzazione di Uluzzo C nella Baia di Uluzzo. C. Vista generale del sito di Uluzzo C (Silvestrini et al., 2021).

Grotta Carlo Cosma, conosciuta come Uluzzo C, è situata sul lato occidentale della costa pugliese (Italia meridionale), sul Mar Ionio. Si trova al centro della Baia di Uluzzo, proprio di fronte alla famosa Grotta del Cavallo, nel Parco Naturale di Portoselvaggio (Nardò) (figura 1).

Il sito è stato scoperto durante le indagini archeologiche condotte nella zona negli anni '60 dall'Istituto Italiano di Preistoria e Protostoria (IIPP), dirette da Edoardo Borzatti von Löwerstern (Borzatti von Löwerstern, 1966, 1965).

Oggi la grotta di Uluzzo C è costituita da una sala centrale con una cavità più piccola sul lato destro, caratterizzata dall'assenza di giacimenti archeologici probabilmente erosi da una recente riattivazione della rete idrografica carsica.

Durante la sua prima esplorazione nel 1963, il giacimento della grotta ha portato alla luce diversi materiali litici molto significativi attribuiti al Paleolitico medio e superiore con industrie riferibili al Musteriano e al complesso tecnologico Uluzziano. Purtroppo, i livelli superiori, contenenti la firma della presenza umana nell'Età del Bronzo, sono stati distrutti dai saccheggiatori, e molto poco si sa a riguardo.

Durante il primo scavo del sito, è stata aperta una fossa di 2,6 x 1,5 m al centro del deposito, raggiungendo una profondità di 2,5 m. Gli scavi sono proseguiti fino al 1966, quando la trincea originale è stata estesa di 1 m². Alla fine dello scavo, il fondo della trincea era a circa 8 m sul livello del mare. All'interno delle sue trincee, Borzatti scavò 22 tagli artificiali identificando nove strati, archeologicamente distinti.

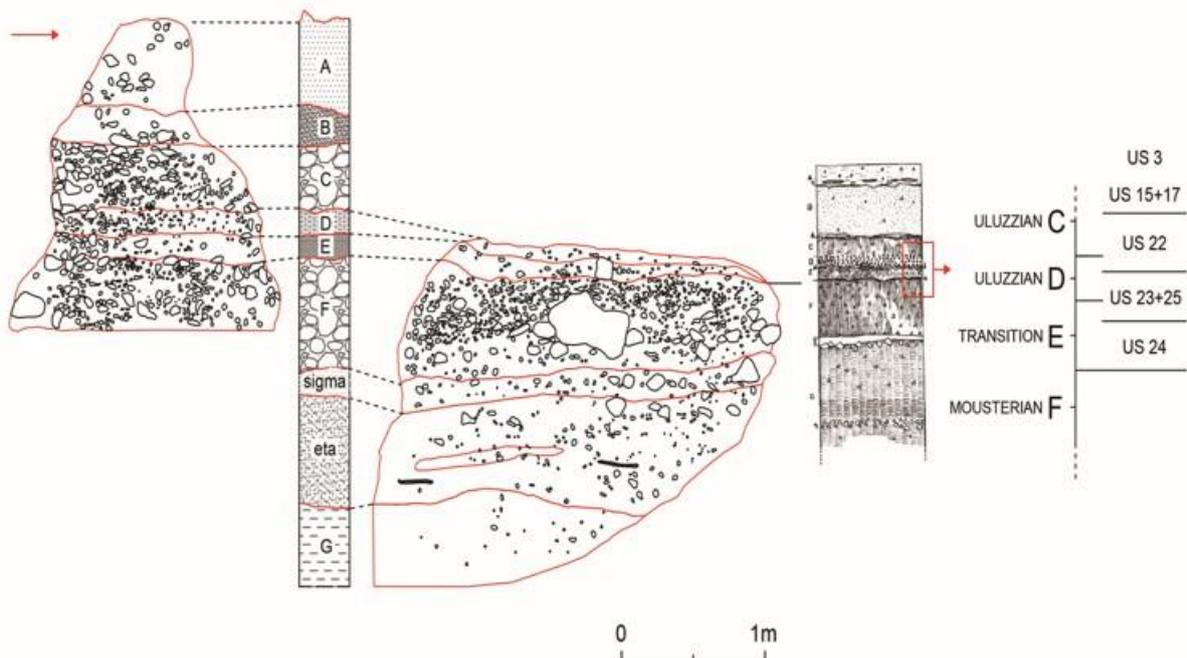


Figura 2: Sequenza stratigrafica del sito di Uluzzo C. Sono riportati gli strati individuati da Borzatti e in corrispondenza di essi le unità stratigrafiche messe in luce negli scavi recenti.

La sequenza archeologica descritta da Borzatti von Lowerstern (1965) e verificata dai risultati dell'analisi dei depositi del sito, è costituita dai seguenti strati (figura 2):

- 1) strato A (0-17 cm), sabbioso-limoso formato da piccole lenti discontinue e agglomerati di sabbia, pomice vulcanica azzurro-chiara e pietre rare (α) associate al periodo Romanelliano (Paleolitico superiore finale);
- 2) lo strato B (18-62 cm) di sabbia vulcanica, mescolata a granelli sabbiosi di quarzo rosso e, nella parte inferiore, a strati sabbiosi di pomice grigia (β), senza materiali archeologici;
- 3) Lo strato C (63-80 cm), attribuito all' Uluzziano, è caratterizzato da detriti rocciosi provenienti dal collasso del tetto del rifugio, ricoperto da un sedimento ricco di noduli di manganese e cementato da carbonato di calcio;
- 4) lo strato D (81-90 cm) è più sciolto e sottile dello strato C e la sua parte inferiore è stata attribuita alla superficie di transizione tra gli strati del Paleolitico medio e superiore; oggi consideriamo lo strato D come Uluzziano, per le caratteristiche della litica sia degli scavi di Borzatti che di quelli attuali.
- 5) Lo strato E (91-100 cm) è caratterizzato da diverse concrezioni di terreno sabbioso rosso ricoperto da un cosiddetto "suolo vulcanico viola" (δ) e segna la transizione con la serie Musteriana degli ultimi tre strati (F-G-H).
- 6) Lo strato F (101-165 cm) è ricco di ghiaia, separato dal successivo strato G da 20 centimetri di sedimento sterile. Il livello F è separato dal livello G da un livello sottile chiamato σ .
- 7) Lo strato G è uno strato più spesso (165-250 cm) e riempie la maggior parte della grotta. Questo sedimento bruno scuro sciolto consiste, nella parte superiore, di frammenti di roccia medio-grandi, ricchi di concrezioni di ossidi di manganese. In questo strato, appare un livello di pietre e ciottoli (η) che tende a pendere leggermente verso l'esterno. A causa del suo spessore massiccio, lo strato G è stato tagliato artificialmente in diversi sottolivelli. È già stato notato (Borzatti von Löwerstern & Magaldi, 1966) che anche l'industria litica Musteriana è spesso coperta da patine ricche di manganese/ferro. Questo strato è particolarmente ricco di lenti di cenere e focolari.
- 8) Lo strato H ha uno strato di sabbia rosso, profondamente cementato nella parte superiore, uno strato grigio sciolto nella parte inferiore, e uno strato marino con grandi ciottoli calcarei (fino a 1 m di lunghezza). Un conglomerato di piccoli clasti a matrice

sabbiosa, calcare e fossili di conchiglie marine segnano il livello sottostante, che è chiaramente riconoscibile come una spiaggia antica (strato L).

Le nuove ricerche archeologiche a Uluzzo C sono iniziate nel 2015 con una prima ispezione seguita dallo scavo vero e proprio nel 2016. Durante la stagione degli scavi, il sito di Uluzzo C è stato suddiviso in tre "Settori": A e B si trovano all'interno del riparo e corrispondono rispettivamente alla superficie del deposito effettivo (Settore A) e al fondo della trincea di Borzatti (Settore B), mentre un terzo settore (Settore C) si trova al di fuori del riparo (Fiorini et al., 2018; Fiorini et al., 2019). Dalle indagini recenti è emerso che le unità stratigrafiche in corso di scavo corrispondono allo strato C e D di Borzatti, cioè uluzziane. Le nuove indagini hanno come obiettivo quello di costruire un'affidabile impostazione cronologica e geologica per gli strati che comprendono il Musteriano Finale e l'Uluzziano, allo scopo di contestualizzare al meglio i nuovi e vecchi materiali di scavo (Spinapolice et al., 2021).

1.2 Materiali analisi archeozoologiche e proteomiche

L'insieme faunistico preso in esame consta di 8646 reperti provenienti dalle unità stratigrafiche 3, 15, 17, 21, 23 e 25 delle campagne di scavo 2017, 2018 e 2019. Ci si è concentrati su queste unità stratigrafiche perché sono state individuate e riconosciute come tre fasi di frequentazione distinte (US 3, US 15+17 e US 21, 22, 23 e 25) tutte ascrivibili a una stessa fase caratterizzata da industria litica uluzziana (Silvestrini et al., 2021).

L'insieme dei resti ossei è caratterizzato da una presenza massiccia di concrezioni e di manganese, tanto che molti campioni hanno richiesto una pulizia accurata con acqua tiepida o con l'aiuto di una penna ad aria compressa, quando particolarmente concrezionati, prima di poter essere analizzati. I reperti che presentavano fratture e distacchi della superficie imputabili a disidratazione o fratture riconducibili allo scavo, sono stati consolidati con colla reversibile UHU.

Tutti i frammenti ossei che risultavano indeterminati tassonomicamente dopo lo studio morfologico sono stati ricontrollati in base ai criteri prima esposti per essere selezionati per l'estrazione del collagene. Si è proceduto quindi alle analisi proteomiche di 46 campioni.

1.3 Risultati analisi archeozoologiche

Insieme faunistico

Di tutti i frammenti ossei analizzati, 612 sono stati identificati a livello tassonomico. Confrontando tutte le unità stratigrafiche, l'US 17 è quella che si presenta più ricca di campioni osteologici. Alcune specie sono rappresentate da pochi resti (*Mustela nivalis*, *Meles meles*, *Martes* sp., *Felis silvestris*, *Lynx lynx*, *Bos* sp. e *Rupicapra* sp.). Le specie più presenti risultano essere *Vulpes vulpes* e *Cervus elaphus*; leggermente meno abbondanti sono l'*Equus ferus* e i cervidi (tabella 2).

Le US 21, 22, 23 e 25 presentano un maggior numero di reperti identificati come *Cervus elaphus*, mentre nell'US 3 ne è stato individuato soltanto uno. I Mustelidi sono molto abbondanti nelle US 15 e 17 mentre nelle US 21, 22, 23 e 25 ne è stato registrato soltanto 1 (*Meles meles*), lo stesso si può dire per le lepri, che risultano nettamente più abbondanti nelle US 15 e 17. Solo in queste due unità stratigrafiche, inoltre, è attestata la presenza di *Felis silvestris* e *Lynx lynx*. Frammenti attribuibili a *Bos/Bison* sono molto pochi (8 in tutte le unità stratigrafiche indagate). Tra i carnivori si registrano in totale 4 frammenti ossei appartenenti a *Canis lupus*. Assente nell'US 3, ma presente in tutte le altre US considerate è *Sus scrofa*. Da notare è la presenza di *Rupicapra* sp. soltanto nelle US 15 e 17 (figura 3).

Al fine di valutare l'abbondanza delle specie all'interno del contesto, è stato calcolato oltre al NISP, anche la stima del numero minimo degli individui (NMI) (Bökönyi, 1970). Il NMI è stato calcolato per le 3 fasi uluzziane individuate (US 3, US 15+17, US 21, 22, 23 e 25).

Per la scarsità dei reperti dell'US 3 sono stati registrati soltanto 1 individuo di *Lepus* sp., 1 *Bos/Bison*, 1 *Cervus elaphus* e 1 individuo di *Vulpes vulpes*.

US 15+17

Lagomorfi e roditori

Leporidae

Lepus sp.: sono stati registrati 8 resti attribuibili a questa specie. Si tratta per lo più di frammenti di denti e diafisi. La scarsità di reperti e l'assenza di elementi diagnostici non consentono di stabilire se si tratti di *Lepus europaeus* o *Lepus corsicanus*, motivo per il quale è stata considerata genericamente come *Lepus* sp.; di questa specie è stata stimata la presenza di un unico individuo adulto.

Carnivori

Canidae

Canis lupus: è stato individuato un unico dente (un molare deciduo inferiore), appartenente a un individuo giovane.

Vulpes vulpes: sono stati identificati 22 resti ascrivibili a questa specie. Per la determinazione del numero minimo degli individui si sono presi in considerazione per lo più i denti e, in base al grado di eruzione e usura dentaria, sono stati identificati 3 individui, 2 adulti e un senile.

Mustelidae

Mustela nivalis: è stato individuato un solo canino superiore riconducibile a questa specie. Di conseguenza il NMI è pari a 1.

Meles meles: è stato identificato un incisivo inferiore appartenente a questa specie. Di conseguenza, è stata stimata la presenza di un solo individuo adulto, in base al grado di usura del reperto.

Martes sp.: è stato identificato un canino deciduo inferiore appartenente a 1 individuo giovane di *Martes* sp.

Felidae

Felis silvestris: sono stati individuati 2 elementi ascrivibili a questa specie: un dente deciduo e una falange III. In base a questi elementi è stato stimato un numero minimo di individui pari a 2: un giovane e un adulto generico.

Lynx lynx: è stato individuato un frammento di premolare superiore IV destro che rappresenta 1 individuo adulto generico.

Ungulati

Artiodactyla

Suidae

Sus scrofa: sono stati individuati 10 reperti appartenenti a questa specie, per lo più denti e falangi. Osservando questi resti, sono stati stimati 2 individui: un giovane e un adulto.

Cervidae

Cervus elaphus: sono stati riconosciuti 16 elementi riconducibili al cervo rosso, molti di questi sono denti che hanno permesso, grazie alla loro osservazione, di stimare la presenza di almeno 3 individui: 1 adulto, 1 adulto di I classe e 1 giovane-adulto.

Capreolus capreolus: 2 sono i resti di capriolo nelle unità stratigrafiche uluzziane 15 e 17 prese in esame e sono entrambi denti. Dall'analisi della loro usura e del grado di eruzione, il NMI è stato stimato a 2: un individuo giovanissimo, rappresentato da una gemma, e un adulto generico.

Bovidae

Bos/Bison: sono 3 i frammenti appartenenti a questa specie ed è stato riconosciuto un dente che, per le sue caratteristiche, può essere riferito a un individuo molto giovane (UC32). Oltre a questo, è stata registrata la presenza di un altro individuo adulto generico.

Caprinae

Rupicapra sp.: sono stati assegnati al camoscio soltanto 3 elementi e di questi, un premolare inferiore è stato classificato come appartenente a un individuo giovane-adulto. Il numero minimo degli individui è stimato a 2.

Perissodactyla

Equidae

Equus ferus: sono stati individuati 14 resti, per la maggior parte denti. Analizzandoli, sono state stimate diverse categorie di individui: un individuo giovane, un giovane-adulto e un adulto di I classe per un totale di 3 individui come numero minimo.

US 21, 22, 23 e 25

Lagomorfi e roditori

Leporidae

Lepus sp.: sono stati registrati 2 resti attribuibili a questa specie. Si tratta di un dente e di una falange che presumibilmente appartengono ad un unico individuo adulto.

Carnivori

Canidae

Canis lupus: sono stati individuati 4 resti (3 denti e un frammento di metatarso) appartenenti a questa specie. In totale sono stati stimati 2 individui, 1 adulto e 1 senile, sulla base dell'usura dentaria.

Vulpes vulpes: sono stati identificati 13 resti ascrivibili a questa specie. Per la determinazione del numero minimo degli individui si sono presi in considerazione per lo più i denti e in base al grado di eruzione e usura dentaria, sono stati riconosciuti 3 individui: 1 giovanissimo rappresentato da un incisivo deciduo superiore, 1 giovane rappresentato da due premolari decidui e 1 adulto generico.

Mustelidae

Meles meles: è stato identificato un incisivo inferiore che, dal grado di usura del dente, può essere considerato senile. Di conseguenza è stata stimata la presenza di un unico individuo senile.

Felidae

Felis silvestris: un astragalo è l'unico elemento che è stato registrato come appartenente a questa specie. Di conseguenza il numero minimo degli individui è stato stimato a 1.

Ungulati

Perissodactyla

Suidae

Sus scrofa: sono stati individuati 7 reperti appartenenti a questa specie, per lo più denti e falangi. Osservando questi resti, sono stati stimati 2 individui: un giovane e un adulto.

Cervidae

Cervus elaphus: sono stati riconosciuti 20 elementi riconducibili al cervo rosso, molti di questi sono denti che hanno permesso, grazie alla loro osservazione, di stimare la presenza di almeno 4 individui: 1 giovane, 1 giovane-adulto, 1 adulto di I classe e 1 adulto di II classe.

Capreolus capreolus: 6 sono i resti di capriolo nelle unità stratigrafiche uluzziane 21, 22, 23 e 25 prese in esame, anche in questo caso sono per la maggior parte denti. Dall'analisi della loro usura e del grado di eruzione, il NMI è stato stimato a 2: un individuo giovanissimo rappresentato da un premolare deciduo e un adulto-senile.

Bovidae

Bos/Bison: sono 2 i frammenti appartenenti a questa specie, una costa e un dente (un premolare deciduo inferiore). In base a questi resti, si è stimata la presenza di un unico individuo.

Perissodactyla

Equidae

Equus ferus: sono stati individuati 3 resti, due denti e un grande cuneiforme appartenenti presumibilmente, in base alle loro caratteristiche, ad un unico individuo.



Figura 3. Alcuni resti di mammiferi determinati dalle US 15 e 17. 1) *Equus ferus*. LM₃. US 15; 2) *Equus ferus*. I_{inferiore}. US 17; 3) *Sus scrofa*. Dente giugale. US 15 V tg.; 4) *Sus scrofa*. RI₁₋₂. US 17 I tg.; 5) *Cervus elaphus*. LI₁ US 17; 6) *Cervus elaphus*. RM₁ US 17 I tg.; 7) *Cervus elaphus*. Prima falange US 17; 8) *Cervus elaphus*. I₃. US 15; 9) *Capreolus capreolus*. RP₂. US 17 I tg.; 10) *Bos/Bison*. I₁₋₂. US 17 I tg.; 11) *Bos/Bison*. LI₄. US 17; 12) *Rupicapra* sp. RM₃. US 17; 13) *Lepus* sp. diafisi prossimale posteriore del femore. US 17 II tg.; 14) *Vulpes vulpes*. RP₄. US 17 II tg.; 15) *Vulpes* sp. falange prossimale. US 15; 16) *Meles meles*. Incisivo inferiore. US 17 I tg.; 17) *Mustela nivalis*. C¹. US 17; 18) *Martes* sp. c₁. US 17 I tg (Silvestrini et al., 2021).

ULUZZO C - SETTORE A	US 3	%	NMI	US 15+17	%	NMI	US 21, 22, 23, 25	%	NMI
Taxa	NISP			NISP			NISP		
<i>Lepus sp.</i>	1	20	1	8	2.4	1	2	0.7	1
TOTALE Rodentia-Lagomorpha	1	20	1	8	2.4		2	0.7	
<i>Canis lupus</i>				1	0.3	1	3	1	2
<i>Vulpes vulpes</i>	1	20	1	26	7.8	3	17	5.9	3
<i>Mustela nivalis</i>				1	0.3	1			
<i>Meles meles</i>				1	0.3	1	1	0.3	1
<i>Martes sp.</i>				1	0.3	1			
<i>Felis silvestris</i>				2	0.6	2			1
<i>Lynx lynx</i>				1	0.3	1			
Carnivora indet.				8	2.4				
TOTALE Carnivora	1	20	1	41	12	10	21	7.3	
<i>Equus ferus</i>				14	4.2	3	3	1	2
<i>Sus scrofa</i>				10	3	2	7	2.4	2
<i>Cervus elaphus</i>	2	40	1	16	4.8	3	19	6.6	4
<i>Capreolus capreolus</i>				2	0.6	2	6	2.1	
<i>Bos/Bison</i>	1	20	1	5	1.5	2	2	0.7	1
Cervidae				10	3		7	2.4	
<i>Rupicapra sp.</i>				3	0.9	2			
Caprinae				5	1.5		1	0.3	
Ungulata	1	20		217	65.1		216	76	
TOTALE Ungulata	3	60		282	85.5		261	91.9	
TOTALE	5	100	2	323	100	14	284	100	
mamm. piccola taglia	1	0.9		19	0.7		17	0.4	
mamm. medio-piccola taglia				22	0.9		17	0.4	
mamm. media taglia	1	0.9		21	0.8		23	0.6	
mamm. media-grande taglia	1	0.9		41	1.7		9	0.2	
mamm. media/grande taglia				4	1.2		4	0.1	
mamm. grande taglia	3	2.8		16	0.6		3	0.07	
mamm. taglia indeterminata	94	87.8		1940	80.9		3405	90.5	
Tot. mammiferi indeterminati	100	93.4		2063	86.1		3478	92.4	
TOTALE NR	105	100		2396	100		3762	100	
Frammenti combusti	16	94.1		517	97.7		549	99.2	
Frammenti calcinati	1	5.8		12	2.2		4	0.7	
Totale combusti	17	100		529	100		553	100	

Tabella 2. Numero di resti identificati (NISP) e Numero minimo degli individui (NMI) delle US 3, 15, 17, 21, 22, 23 e 25

1.4 Risultati analisi tafonomiche

Modificazioni non antropiche

L'insieme dei resti risulta fortemente frammentato in quanto il 97.2 % dei reperti analizzati è inferiore ai 3 cm. Tra gli agenti naturali che hanno influenzato e caratterizzano contemporaneamente anche più di una superficie delle ossa prese in esame, gli apparati radicali hanno agito soltanto sull'1.3 % dei resti, 15 frammenti ossei risultano avere una certa esfoliazione sulla superficie, meno di una decina di campioni appaiono arrotondati come per effetto della fluitazione dovuta all'acqua, mentre altrettanti presentano dei weathering cracks. La maggior parte dei reperti mostra una forte concrezione sulla superficie (il 69,5 %) associata a uno scuro strato di ossidi di manganese (64,9 %).

Modificazioni antropiche

I reperti combusti registrati per le unità stratigrafiche uluzziane prese in esame sono 1161 pari al 13,4 % dell'intero campione analizzato. In particolare, 1139 risultano combusti quindi presentano una colorazione scura (nera o marrone) e soltanto 22 frammenti ossei invece, sono calcinati.

Nella totalità degli elementi combusti, alcuni sono stati identificati a livello tassonomico come una diafisi distale di una tibia di Cervide e anche un sesamoide di un carnivoro di medie dimensioni. Degli indeterminati (1114), 35 sono diafisi e 9 frammenti di epifisi, mentre gli altri risultano completamente indeterminati.

In associazione alla combustione, una diafisi di ungulato presenta punti di impatto e incavi e sembra essere stato utilizzato come ritoccatore. Altre due diafisi di ungulato sono state identificate come coni di percussione che testimoniano, insieme agli altri 12 coni di percussione non combusti e non specificatamente determinati, che ad Uluzzo C veniva praticata l'attività di fratturazione delle ossa con l'obiettivo di recuperarne il midollo.

Tracce lasciate dall'uomo durante la macellazione e lo sfruttamento delle carcasse sono visibili soltanto su 6 resti; due si riferiscono a *Cervus elaphus* e in particolare sulla diafisi di una tibia e l'altra sulla diafisi di un metacarpo e una su un femore di *Lepus* sp. (figura 4). In quest'ultimo caso le tracce si riferiscono a delle raschiature. Infine, altre tracce di origine antropica sono state

riscontrate sul corpo di una costa di bovide e su una diafisi di ungulato. In generale tutti questi cutmarks sono legati ad attività di scarnificazione e/o associati alla rimozione di masse muscolari.



Figura 4. Ossa con tracce di origine antropica dalle US 15 e 17. 1) costa di *Bos/Bison* con tracce di macellazione dall'US 17 II tg. A-e ingrandimento della traccia; 2) Punti di impatto rispettivamente dalle US 17 II tg. E 17; 3) Costa di Ungulato di media-grande taglia con tracce di macellazione dall'US 17 II tg. Ingrandimento; 4) Diafisi prossimale di femore di *Lepus* sp. con tracce di raschiatura dall'US 17 II tg. A+a' ingrandimento della traccia (Silvestrini et al., 2021).

1.5 Risultati ZooMS

In questo particolare contesto, l'apporto della ZooMS non è stato fondamentale (tabella 3) perché soltanto 17 campioni (su 46) hanno fornito informazioni tassonomiche utilizzando i markers peptidici presenti in letteratura (Buckley et al., 2009; Welker et al., 2016.)

ULUZZO C - SETTORE A	US 3	%	US 15+17	%	US 21, 22, 23, 25	%	ZooMS	%	Totale	%
Taxa	NISP		NISP		NISP		NISP			
<i>Lepus sp.</i>	1	20	8	2.4	2	0.7			11	1.7
TOTALE Rodentia-Lagomorpha	1	20	8	2.4	2	0.7			11	1.7
<i>Canis lupus</i>			1	0.3	3	1	1	5.8	5	0.7
<i>Vulpes vulpes</i>	1	20	26	7.8	17	5.9	1	5.8	45	7
<i>Mustela nivalis</i>			1	0.3					1	0.1
<i>Meles meles</i>			1	0.3	1	0.3			2	0.3
<i>Martes sp.</i>			1	0.3					1	0.1
<i>Felis silvestris</i>			2	0.6			1	5.8	3	0.4
<i>Lynx lynx</i>			1	0.3					1	0.1
Carnivora indet.			8	2.4			1	5.8	9	1.4
TOTALE Carnivora	1	20	40	12	21	7.3	4	23.5	65	10.1
<i>Equus ferus</i>			14	4.2	3	1	3	17.6	20	3.1
<i>Sus scrofa</i>			10	3	7	2.4			17	2.6
<i>Cervus elaphus</i>	2	40	16	4.8	19	6.6			37	5.7
<i>Capreolus capreolus</i>			2	0.6	6	2.1			8	1.2
<i>Bos/Bison</i>	1	20	6	1.5	2	0.7	2	11.7	11	1.7
Cervidae			10	3	7	2.4	2	11.7	19	2.9
<i>Rupicapra sp.</i>			3	0.9					3	0.4
Caprinae			5	1.5	1	0.3			6	0.9
Ungulata	1	20	217	65.1	216	76	6	35.2	440	68.8
TOTAL Ungulata	3	60	285	85.5	261	91.9	13	76.4	562	87.9
TOTALE NISP	5	100	333	100	284	100	17	100	639	100
mamm. piccola taglia	1	0.9	19	0.7	17	0.4			37	0.5
mamm. medio-piccola taglia			22	0.9	17	0.4			39	0.6
mamm. media taglia	1	0.9	21	0.8	23	0.6			45	0.7
mamm. media-grande taglia	1	0.9	41	1.7	9	0.2			51	0.8
mamm. media/grande taglia			4	1.2	4	0.1			8	0.1
mamm. grande taglia	3	2.8	16	0.6	3	0.07			22	0.3
mamm. taglia indeterminata	94	87.8	1940	80.9	3405	90.5			5439	86.6
Tot. mamm. indeterminati	100	93.4	2063	86.1	3478	92.4			5641	89.8
TOTALE NR	105	100	2396	100	3762	100			6280	100
Frammenti combusti	16	94.1	517	97.7	549	99.2			1082	98.4
Frammenti calcinati	1	5.8	12	2.2	4	0.7			17	1.5
Totale combusti	17	100	529	100	553	100			1099	100

Tabella 3. Tabella riassuntiva generale dell'analisi tassonomica. In tabella è presente il NISP ottenuto dalle analisi morfologiche dei reperti delle 3 fasi uluziane individuate (US 3, US 15+17, US 21, 22, 23 e 25) ad Uluzzo C a confronto con il NISP ottenuto dalle analisi ZooMS e il NISP totale combinando le due tecniche.

Questa mancanza di risultati tassonomici, ci fornisce un'importante informazione sul contesto, in cui il collagene risulta essere poco e mal conservato. Dalle analisi riportate in Spinapolice et al., 2021 il sedimento si caratterizza come moderatamente alcalino a causa dell'elevata quantità di carbonati presenti, con pH intorno a 8. Dagli studi di Wehmiller (1977), Miller et al. (1992), Collins & Demarchi (2015), Cleland & Schroeter (2018) sappiamo che queste caratteristiche del terreno possono indurre deamidazione nei campioni ivi sepolti. Infatti, in tutti i campioni, il peptide P1105 risulta fortemente deamidato, suggerendo la presenza di collagene endogeno antico, fornendo garanzia della sua autenticità e indicazioni sul suo stato di preservazione. È stato possibile identificare 3 campioni di Equidae, 2 di *Bos/Bison*, 1 di *Vulpes vulpes*, 1 di *Felis silvestris* (figura 5), 2 di Cervidae e 6 ungulati. Questi ultimi, sono stati classificati genericamente come ungulati perché non sono stati individuati i peptidi diagnostici che permettono di distinguere tra Cervidae, Bovidae, Caprinae e Equidae (tabella 4).

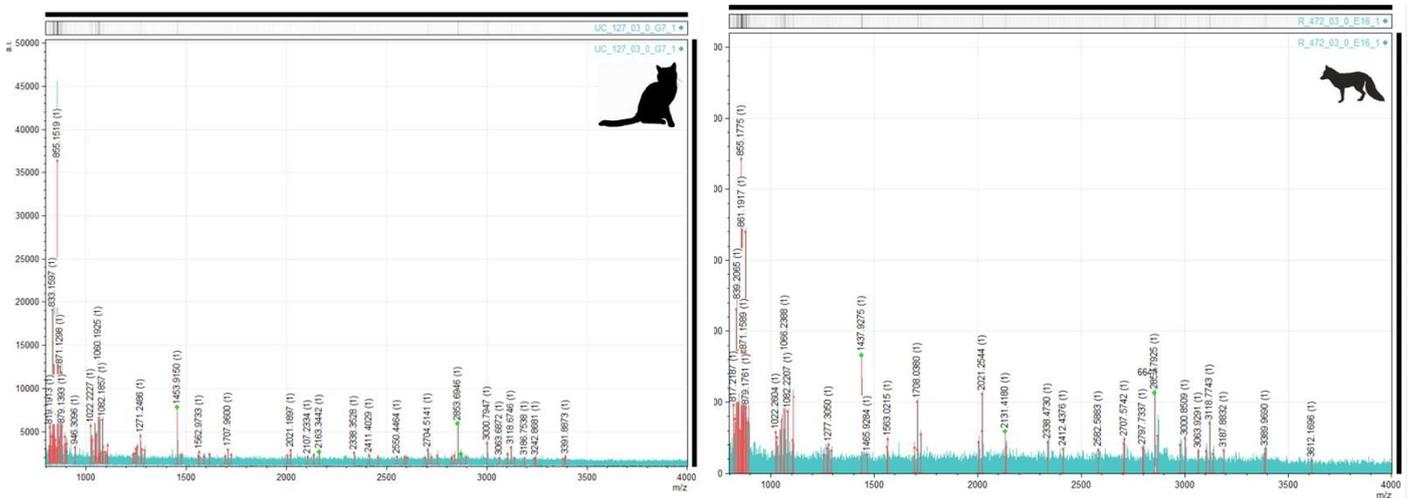


Figura 5. Spettro el campione UC127 identificato come *Felis silvestris* e spettro del campione R472 identificato come *Vulpes vulpes*.

ID. Lab	P1	A	A'	B	C	P2	D	E	F	F'	G	G'	identificazione ZooMS
R546	1105.6			1427.7			2145.1		2883.4	2899.4			<i>Equus ferus</i>
UC127	1105.6			1453.7			2163.1		2853.4	2869.4			<i>Felis silvestris</i>
R391													no determinazione
R552													no determinazione
R638													no determinazione
UC215													no determinazione
R694													no determinazione
UC216													no determinazione
R506													no determinazione
R753													no determinazione
R533	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1						Bovidae/Ovis-Caprinae/Cervidae
R750													no determinazione
R618													no determinazione

R614	1105.6		1427.7							Ungulata
UC172										no determinazione
UC179										no determinazione
R612	1105.6		1427.7		1648.8	2131.1	2883.4			Cervidae/Ovis-Caprinae
R575										no determinazione
R679										no determinazione
R738										no determinazione
R505										no determinazione
UC198										Cervidae/Ovis-Caprinae
UC109										no determinazione
R518	1105.6		1427.7			2131.1	2883.4			Cervidae/Ovis-Caprinae
R654										no determinazione
UC142										no determinazione
R728										no determinazione
R538										no determinazione
R472	1105.6		1437.7			2131.1	2853.4			<i>Vulpes vulpes</i>
R591										no determinazione
R570	1105.6		1427.7			2145.1	2883.4			<i>Equus ferus</i>
R743	1105.6		1427.7	1580.8		2131.1	2853.4			<i>Bos/Bison</i>
UC146	1105.6		1427.7			2131.1	2883.4			Cervidae/Ovis-Caprinae
R595										no determinazione
R632	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1	2883.4			Cervidae
R34	1105.6									no determinazione
R35	1105.6		1427.7	1550.8			2883.4			Cervidae/ <i>Equus ferus</i>
R116	1105.6		1427.7	1550.8		2145.1	2883.4	2899.4		<i>Equus ferus</i>
R254	1105.6									no determinazione
UC81	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8	2131.1	2853.4			<i>Bos/Bison</i>
UC86	1105.6		1427.7	1550.8						Cervidae/ <i>Equus ferus</i>
UC88 I	1105.6		1427.7							Ungulata
UC89 II	1105.6		1427.7		1648.8					Bovidae/Ovis-Caprinae/Cervidae
UC90	1105.6									no determinazione
UC91	1105.6		1427.7	1550.8	1649.8		2883.4			<i>Equus ferus</i>
UC92	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1	2883.4			Cervidae

Tabella 4. Marcatori peptidici individuati con le analisi ZooMS e determinazioni tassonomiche dei campioni delle unità stratigrafiche uluziane di Uluzzo C.

1.6 Discussione

Al fine di ricostruire la composizione della fauna a Uluzzo C, fondamentale è stato l'apporto delle analisi archeozoologiche. Sono stati determinati tassonomicamente il 7.3% dei resti ossei, nonostante più del 97 % dei reperti fosse inferiore ai 3 cm, quindi particolarmente frammentati. La prevalenza di cervidi di media e medio/grande taglia in associazione alla volpe rossa, sembra indicare un clima temperato e ambienti boschivi inframezzati da radure. La presenza di bovini suggerisce la disponibilità di ambienti forestati radi ma anche un ambiente con clima più temperato freddo. Gli equidi indicano la disponibilità nei pressi del sito, di ampie praterie aperte. In conclusione, quello che si delinea è un ambiente abbastanza variegato, confermato anche dalle analisi effettuate sui micromammiferi e sull'avifauna, che risultano essere entrambe

coerenti con la composizione faunistica generale del sito. La predominanza del *Microtus (Terricola) savii*, insieme alla presenza di *Apodemus (Sylvaemus) sp.* e *Myotis myotis*, è indicativa di un paesaggio discontinuo composto da habitat di foreste aperte e praterie. Per quanto riguarda l'avifauna, resti di *Melanocorypha Calandra* suggeriscono la presenza di praterie e steppe, mentre il *Pyrhacorax Pyrhacorax* ben si adatta all'ambiente di scogliere rocciose e falesie con aree prative, ancora oggi disponibili intorno al sito di Uluzzo C (Silvestrini et al., 2021).

I campioni si presentavano macroscopicamente molto concrezionati e in uno stato tafonomico particolarmente compromesso; per quanto al momento del campionamento per le analisi proteomiche si è tentato di evitare le zone che si presentavano peggiori dal punto di vista tafonomico (Simpson et al., 2016), gli spettri ottenuti dalle analisi in MALDI-MS hanno fornito molti pochi picchi. Mentre per i campioni che, anche all'aspetto si presentavano meglio conservati, è stato possibile rilevare un maggior numero di marcatori peptidici che hanno permesso di effettuare la determinazione tassonomica del campione.

Purtroppo, l'utilizzo della proteomica in questo contesto non è stato particolarmente informativo, a causa della scarsa conservazione del collagene nei reperti. Considerato infatti il clima caldo dell'area (17.6 °C è la temperatura media annua registrata), il peculiare stato di conservazione dei reperti stessi (i.e. frequenti e abbondanti concrezioni calcaree) e le caratteristiche del sedimento (alcalino) la mancanza di collagene era attesa. I pochi dati ottenuti sono però in linea con quelli ricavati dall'analisi morfologica dei frammenti, suggerendo la possibilità di ricavare informazioni tassonomiche (seppur parziali) anche da contesti in cui la conservazione del collagene non risulta ottimale.

2. Riparo del Broion

2.1 Il sito e gli scavi archeologici

Il Riparo del Broion si trova in provincia di Vicenza, sui Colli Berici, nella frazione di Lumignano del Comune di Longare, su un altopiano carsico che si estende per quasi 200 km² a S-E dei Monti Lessini. Pochi chilometri (10) più a Est si trovano i rilievi di origine vulcanica dei Colli Euganei (figura 6).

L'altopiano presenta due valli principali, la Val Liona e la Valle di Fimon. Nella zona orientale, affacciate sulla grande pianura alluvionale, si aprono diverse grotte e ripari che testimoniano frequentazioni antropiche nel corso del Paleolitico, tra le quali il Riparo, la Grotta e il Buso Doppio del Broion, la Grotta Maggiore e Minore di San Bernardino, il Covolo di Trene, Grotta del Col della Stria e Grotta di Paina.



Figura 6. Localizzazione del Riparo del Broion sui Colli Berici

Il Riparo del Broion si colloca a 135 m s.l.m., lungo una ripida parete rocciosa che collega la cima del Monte Brosimo (327 m s.l.m.) alla pianura. Il rifugio si è formato da un crollo della roccia in seguito a processi termoclastici e di dissoluzione chimica. Il Riparo, lungo una decina di metri, è protetto da un aggetto di 6 m e presenta un riempimento parzialmente asportato in epoche storiche per regolarizzare la superficie di calpestio e di conseguenza impiegarlo come ricovero o deposito per la legna e il fieno (Peresani et al., 2019).

Nel 1948 il dott. da Schio promosse le prime ricerche sistematiche, realizzate ad opera del Prof. Leonardi e da un gruppo di ricercatori dell'Università di Ferrara nelle Grotte e nei Ripari sottoroccia del versante orientale dei Colli Berici, portando alla luce numerose testimonianze delle occupazioni antropiche paleolitiche, in particolar modo per quel che concerne l'ultimo glaciale (Bartolomei, 1960; Bartolomei et al., 1977, 1988; Broglio, 1965, 2003a, 2003b; Broglio

et al., 2005; Cattani, 1990; De Stefani et al., 2005; Leonardi, 1959; Leonardi & Broglio, 1960-61, 1961, 1962, 1965; Leonardi et al., 1962; Sala, 1980, 1990).

I primi scavi archeologici sono stati diretti e supervisionati dal Prof. Alberto Broglio e dai Dott.ri Mirco De Stefani e Fabio Gurioli dal 1998 al 2008 e dal Dott. Matteo Romandini dal 2015 al 2021. L'area d'indagine si estende per circa 20 mq al di sotto dell'aggetto roccioso. Sono state scoperte una sequenza Pleistocenica con resti faunistici e una sequenza culturale caratteristica della transizione tra Paleolitico medio e superiore (De Stefani et al. 2005; Peresani et al., 2019; Romandini et al., 2020).

Gli scavi sistematici si sono concentrati sulla parte alta del deposito, formato principalmente da sedimenti limosi, da clasti e da concrezioni carbonatiche. Ad oggi, sono state individuate almeno 20 unità stratigrafiche. In questo lavoro sono state analizzate nello specifico l'US musteriana 11 ed i livelli uluzziani 1f e 1g. Nello specifico, infatti, l'unità stratigrafica 1 è stata divisa in sette sottounità (livelli), da 1g a 1a ed è stata riconosciuta questa sequenza culturale: Epigravettiano Antico (strati 1a-1b), Gravettiano (1c-1d), Uluzziano (1e-1f-1g) e Musteriano (unità 4-7-9-11). Apparentemente, non sono emerse prove di attività antropica nelle unità 2 e 3 (figura 7). Peresani e colleghi (2019) hanno attribuito le evidenze culturali provenienti dalle US 1g, 1f e 1e all'Uluzziano, sulla base delle caratteristiche tecno-tipologiche dell'assemblaggio litico e di alcune datazioni al radiocarbonio, confermando la presenza di questa cultura di transizione nell'Italia Settentrionale.

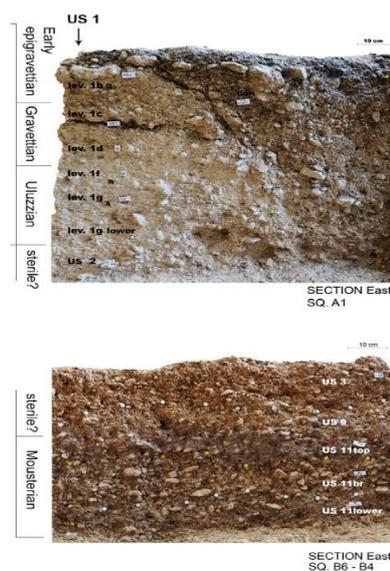


Figura 7. Sequenza stratigrafica del sito del Riparo del Broion (Romandini et al., 2019)

Il livello 1g dell'unità stratigrafica 1 si presenta fortemente concrezionato e mineralizzato ed è costituito da una matrice limo-sabbiosa con presenza di cenere. Il colore biancastro-grigio è diretta conseguenza della calcificazione e mineralizzazione dello strato. Tra i materiali archeologici rinvenuti ci sono poche ossa, alcune combuste, e diverse selci tra cui soprattutto pezzi scagliati. Presenti anche carboni millimetrici ma ben strutturati. Sono stati individuati almeno due focolari, uno dei quali strutturato con pietre apposte a forma sub-circolare. Ad essi sono associati piccoli carboni millimetrici anche strutturati, cenere, frammenti di ossa bruciate e manufatti in selce termicamente alterata. Lo strato è stato datato a 38,900±1000 BP (Peresani et al., 2019).

La sottounità 1f ha il limite superiore poco marcato, e in alcune aree è indistinguibile da 1e. È composta da una matrice limosa di colore marrone molto pallido, con scarsi clasti sub-arrotondati fino a 6 cm di diametro e di 8÷15 cm di spessore. È interessata da numerose bioturbazioni e da processi erosivi a ridosso della parete.

La sottounità 1e è costituita da una matrice limosa di colore marrone chiaro giallastro, con scarse ghiaie e ricca in clasti a spigoli vivi o sub-arrotondati fino a 3 cm di diametro. Lo spessore è compreso tra 4 e 10 cm. È presente in lenti con un andamento discontinuo sub-orizzontale.

L'unità stratigrafica 11 è stata suddivisa in: 11 tetto, 11, 11 BR e 11 base; copre l'US 13 ed è coperta dall'US 9. L'US 9, i cui materiali sono ancora in corso di studio, evidenzia l'ultima frequentazione Musteriana del sito ed è separata dai livelli uluzziani 1f e 1g da US 2, che ad oggi, sembra essere un livello sterile. L'US11, oggetto di studio di questo elaborato, è stata indagata parzialmente e presenta limiti superiori gradualmente con l'US 9. Ha distribuzione orizzontale e risale verso Est. Numerose bioturbazioni riguardano sia il tetto dell'US che il corpo e si possono riconoscere dalla matrice e dal colore che vira al giallo in corrispondenza di esse. Il colore dell'unità stratigrafica varia dal grigio scuro al bruno/giallastro. I limiti inferiori con US 13 sono netti per colore e composizione (gialla e con minor quantità di brecce). La matrice risulta franco limosa/limo-sabbiosa con presenza diffusa ma disomogenea di brecce di piccole e medie dimensioni con spigoli poco arrotondati. La porosità è alta e la consistenza abbastanza friabile. Lo strato è ricco di ossa anche di grandi dimensioni, molte di esse combuste, presenza diffusa di selce, numerosi manufatti ritoccati e anche in questo caso reperti termoalterati. La presenza di carboni si fa consistente specialmente in corrispondenza delle strutture di combustione rilevate all'interno dello strato. In base a tutti questi dati si può affermare che l'US11 è caratterizzata da attività antropica intensa, e testimonia ripetute

frequentazioni associate all'accensione di fuochi e al consumo e processamento di carcasse animali. La porzione inferiore dell'US11 è stata datata tra 50,000 e 45,700 anni Cal BP (Romandini et al, 2020).

Gli studi tassonomici e tafonomici dei resti faunistici sono stati di supporto per meglio comprendere la funzione del sito, sia per l'uomo che per gli animali che lo frequentavano, fornendo talvolta indicazioni utili sul tipo di occupazione e sulle modalità di sfruttamento della superficie abitata. Si tratta comunque di risultati in evoluzione, in quanto gli scavi sono tuttora in corso.

2.2 Materiali analisi archeozoologiche e proteomiche

L'insieme faunistico preso in esame consta di 22485 reperti provenienti dalle unità stratigrafiche musteriane 11 tetto, 11, 11 BR e 11 base e 12165 frammenti ossei provenienti dai livelli uluzziani 1g, 1f e 1e.

L'insieme dei resti ossei è caratterizzato da concrezioni e manganese, che hanno reso necessaria la pulizia dei reperti con pennello a setole morbide in acqua tiepida e, per i frammenti che si presentavano particolarmente concrezionati, con una penna ad aria compressa, per poter leggere meglio la situazione tafonomica dei diversi frammenti. I reperti che presentavano fratture e distacchi della superficie imputabili a disidratazione o fratture riconducibili allo scavo, sono stati consolidati con colla reversibile UHU.

Tutti i frammenti ossei che risultavano indeterminati dal punto di vista tassonomico sono stati ricontrollati per poi essere selezionati, in base ai criteri descritti precedentemente, per le analisi proteomiche. Sono stati quindi sottoposti alle analisi proteomiche 153 campioni. In particolare, 58 dell'US11 e 95 dell'US1.

2.3 Risultati analisi archeozoologiche

2.3.1 Unità stratigrafica musteriana US11 (11 tetto, 11, 11 BR, 11 base)

	<i>RB US11 (11 tetto, 11, 11 BR, 11 base)</i>		
<i>Taxa</i>	NISP	%	NMI
<i>Lepus sp.</i>	1	0.2	1
<i>Marmota marmota</i>	1	0.2	1
<i>Castor fiber</i>	225	49.6	6
Totale Lagomorpha e Rodentia	227	50.1	8
<i>Canis lupus</i>	7	1.5	3
<i>Vulpes sp.</i>	5	1.1	1
<i>Vulpes alopex</i>	1	0.2	1
<i>Ursus arctos</i>	3	0.6	2
<i>Ursus spelaeus</i>	1	0.2	1
<i>Ursus sp.</i>	7	1.5	1
<i>Crocota Crocuta spelaea</i>	2	0.4	1
<i>Felis silvestris</i>	1	0.2	1
Carnivora indet.	15	3.3	
Totale Carnivora	42	9.2	11
<i>Sus scrofa</i>	9	1.9	3
<i>Megaloceros giganteus</i>	11	2.4	1
<i>Alces alces</i>	2	0.4	1
<i>Cervus elaphus</i>	17	3.7	2
<i>Capreolus capreolus</i>	5	1.1	2
Cervidae indet.	36	7.9	
<i>Bos/Bison</i>	2	0.4	1
<i>Rupicapra rupicapra</i>	3	0.6	1
Caprinae indet.	4	0.8	
<i>Equus ferus</i>	2	0.4	2
<i>Equus sp.</i>	1	0.2	1
Ungulata indet.	92	20.3	
Totale Ungulata	184	40.6	
Totale NISP	453	100	
mamm. piccola taglia	134	0.6	
mamm. media-piccola taglia	8	0.03	
mamm. media taglia	9	0.04	
mamm. media-grande taglia	56	0.2	
mamm. media/grande taglia	18	0.08	
mamm. grande taglia	111	0.5	
Mamm. taglia indeterminata	21373	96.4	
Tot. mammiferi indeterminati	21711	97.9	
TOTALE NR	22162	100.0	
Frammenti combusti	9485	84.4	
Frammenti calcinati	1750	15.5	
Totale combusti	11235	100	

Tabella 5. Tabella tassonomica e tafonomica riassuntiva generale delle unità stratigrafiche 11 tetto, 11, 11 BR, 11 base del Riparo del Broion (RB).

Insieme faunistico

Di 22162 reperti, 453 sono stati identificati a livello tassonomico; quindi, è stato determinato soltanto il 2 % dei resti. Nei casi in cui non è stato possibile risalire alla specie, si è registrata solamente la probabile dimensione del mammifero. Degno di nota è l'altissimo numero di resti identificati come *Castor fiber* (NISP=225), tra le altre specie più rappresentate si registrano per lo più ungulati di media e medio-grande taglia: cervidi (NISP=36), *Cervus elaphus* (NISP=17), *Megaloceros giganteus* (NISP=11) e *Sus scrofa* (NISP=9). Meno abbondanti sono i resti di *Bos/Bison*, *Capreolus capreolus*, *Rupicapra rupicapra* e *Equus ferus*.

Tra i resti di carnivori identificati: *Ursus* sp. (NISP=7), *Ursus spelaeus* (NISP=1), *Ursus arctos* (NISP=3) e *Canis lupus* (NISP=7). Da segnalare anche la presenza di 15 frammenti di carnivori indeterminati. Nel complesso quindi, la varietà di taxa di carnivori all'interno del record faunistico dell'US11 del Broion risulta essere in equilibrio rispetto a quella degli ungulati. (tabella 5 e figura 8).

Al fine di valutare l'abbondanza delle specie nel livello musteriano del Riparo del Broion, è stato effettuato il calcolo non solo del NISP ma anche del numero minimo degli individui (NMI) (Bökönyi, 1970).

Lagomorfi e roditori

Leporidae

Lepus sp.: è stato individuato un unico elemento scheletrico attribuibile a questa specie. Un acetabolo con ischio che può essere riferito a un individuo adulto.

Marmota marmota: è stato identificato un solo dente di *Marmota marmota* che è stato interpretato come adulto generico e permette di stimare un numero minimo di individui pari a uno.

Castor fiber: come già accennato, sono stati registrati 225 resti ossei di castoro. Una più approfondita disamina verrà fatta in seguito. Il numero minimo degli individui è stato stimato a 6, 2 individui giovani e 4 adulti.

Carnivori

Canidae

Canis lupus: sono stati registrati 7 frammenti riferibili a questa specie (3 falangi, 1 calcagno, 2 denti e 1 ulna). Il numero minimo degli individui è stato stimato a 3; 1 individuo giovane (<12 mesi) probabilmente maschio e di grande taglia rappresentato da RB222, un individuo probabilmente di sesso femminile rappresentato da RB313, RB285 e RB279 con dimensioni ridotte forse anche dall'esposizione al fuoco, e un adulto di II classe rappresentato dai frammenti 98 e RB16.

Vulpes sp.: sono stati individuati 5 resti ascrivibili a questo animale, tutti denti e una patella. Il numero minimo di individui è stato stimato a 1 e dalle caratteristiche legate al grado di usura dentaria sembra essere un adulto.

Vulpes alopex: è stata attribuita a questa specie un'emimandibola, sulla base dei caratteri morfologici e per le ridotte dimensioni dell'elemento. Di conseguenza, il numero minimo degli individui stimato è di uno.

Ursidae

Ursus sp.: tra i resti ad esso riferiti (NR=7) si ritrovano gli elementi per i quali non è stato possibile distinguere tra *Ursus arctos* e *Ursus spelaeus*. Questi sono per lo più denti e due vertebre. Il numero minimo è stato stimato a un individuo giovane.

Ursus spelaeus: per quanto riguarda *Ursus spelaeus* è stato individuato con certezza un resto (una falange III) che testimonia la presenza all'interno del sito di un individuo adulto.

Ursus arctos: sono stati determinati come *Ursus arctos* tre resti (due frammenti di radio e 1 dente) che sono da riferire complessivamente a 2 individui adulti.

Ungulati

Artiodactyla

Suidae

Sus scrofa: è stato possibile individuare 9 frammenti dentari attribuibili a questa specie. Trattandosi di denti, è stato possibile ottenere informazioni anche sull'età degli individui presenti nel sito e di conseguenza è stato stimato un numero minimo di 3. Nello specifico, sono stati riconosciuti: un individuo giovane rappresentato da RB124, RB374 e RB159, un giovanissimo (RB302) e un adulto rappresentato da RB86 e RB117.

Cervidae

Alces alces: di questa specie sono state determinate due falangi II rudimentali di cui non è stato possibile determinare la lateralità, di conseguenza, non avendo la certezza che si possa trattare dello stesso elemento anatomico e quindi, di due individui differenti, si è stimata la presenza di un unico individuo adulto.

Megaloceros giganteus: sono stati identificati 11 resti, per 8 dei quali si suggerisce un confronto. Si tratta di diversi frammenti diafisari di tibia, falangi, un frammento di emimandibola, un metatarso, un metapodiale e un frammento di radio-ulna. Alcuni reperti vengono assegnati a questa specie in quanto, per dimensioni, escono dal range di variabilità del *Cervus elaphus*. I resti di questo grande cervide che si hanno a disposizione, portano a stimare la presenza di un unico individuo adulto.

Cervus elaphus: è stato possibile associare a questa specie 17 frammenti ossei. Si tratta per lo più di denti, frammenti diafisari di tibia e femore, frammenti di metacarpo e metatarso. Prendendo in esame tutti questi elementi a disposizione, è stato stimato un numero minimo di individui pari a 2; nello specifico, un individuo adulto rappresentato da RB419, Ril.76, Ril.46, Ril.107, Ril.5 e Ril.87 e un altro individuo adulto di taglia inferiore rappresentato da RB411, RB301 e RB421.

Capreolus capreolus: è stato possibile determinare soltanto 5 frammenti ossei di capriolo. Gli elementi identificati sono denti, falangi e un frammento di diafisi prossimale posteriore di radio. Analizzando il grado di usura dentaria, sono stati stimati 2 individui: un senile rappresentato da RB23 e un individuo adulto di I classe rappresentato da Ril.195 e RB98.

Caprinae

Rupicapra rupicapra: sono stati attribuiti al camoscio 2 denti e 1 frammento di falange I. Sulla base di questi elementi, è stata stimata all'interno del contesto, la presenza di un individuo adulto.

Perissodactyla

Equidae

Equus ferus: sono stati identificati due frammenti diafisari di tibia e uno di dente. I due frammenti di tibia hanno entrambi la stessa lateralità, confrontandoli è plausibile supporre che appartengano a due individui differenti. In particolare, riguardo RB401 non è possibile ricavare informazioni sull'età, ma sembra essere un individuo di taglia inferiore rispetto a Ril.173. Di conseguenza il numero minimo degli individui è stato stimato a 2.

Felidae

Felis silvestris: è stato riconosciuto soltanto un premolare IV superiore appartenente a *Felis silvestris*, testimonianza della presenza di un individuo adulto all'interno del contesto.

Hyaenidae

Crocuta crocuta spelaea: alla iena maculata sono stati attribuiti un frammento di parte molare dell'emimandibola destra e un premolare II inferiore. In base a questi elementi è possibile stimare la presenza di almeno un individuo adulto di questa specie.



Figura 8. Alcuni resti di mammiferi determinati dall'US 11. 1) *Capreolus capreolus*. M¹. 2) *Alces alces*. II falange rudimentale. 3) *Megaloceros giganteus*. III falange rudimentale. 4) *Cervus elaphus*. Metatarso. 5) *Equus ferus*. Diafisi medio-distale posteriore di tibia destra. 6) *Ursus arctos*. Canino. 7) *Sus scrofa*. Dente jugale. 8) *Crocuta crocuta*. P₂. 9) *Vulpes alopec*. Emimandibola. 10) *Canis lupus*. Calcagno sinistro. 11) *Vulpes* sp. I³. 12) *Lepus europaeus*. Acetabolo e ischio destro.

2.3.1.1 Risultati analisi tafonomiche US11

Modificazioni non antropiche

L'insieme dei resti risulta molto frammentato, 97.4% dei frammenti è inferiore ai 3 cm. Tra gli agenti naturali che hanno influenzato e caratterizzano contemporaneamente anche più di una superficie delle ossa prese in esame, gli apparati radicali hanno agito soltanto sullo 0.1% dei frammenti ossei, 30.6% presentano concrezioni, meno di una decina di frammenti mostrano esfoliazioni sulla superficie. Soltanto 3 frammenti appaiono arrotondati come per effetto della fluitazione dell'acqua e 9 sembrano aver subito una corrosione. Tracce di denti di carnivoro si ritrovano su 4 resti, mentre tracce di rosicchiature da parte di roditori soltanto su 2. Ossidi di manganese caratterizzano il 9.5% dei reperti.

Modificazioni antropiche

In base all'esposizione (durata, intensità e temperatura) a fonti di calore dei resti ossei, si producono delle caratteristiche variazioni di colore che sfumano dal giallo avorio (circa 200°), al marrone/nero (circa 300-400°) al bianco (>700°), oltre a variazioni che riguardano anche la composizione chimica dell'osso andandolo a privare sempre di più della componente organica e provocando anche delle microfratturazioni che possono portare alla fratturazione del reperto stesso.

I reperti combusti registrati per l'US11 sono 11235 pari al 50.6% dell'intero campione analizzato. In particolare, 9485 frammenti ossei sono combusti, quindi presentano una colorazione che va dal marrone al nero e 1750 invece risultano calcinati cioè presentano una colorazione bianca.

Nella totalità degli elementi combusti (11235), da sottolineare la presenza di una falange rudimentale di *Alces alces*, un'epifisi prossimale di falange I e un frammento diafisario di ulna di *Canis lupus*, una falange e un frammento di radio di *Capreolus capreolus*, 30 frammenti ascrivibili a diversi distretti scheletrici di *Castor fiber*, due frammenti diafisari di tibia di *Cervus elaphus*, un metatarso e un frammento di tibia di *Megaloceros giganteus*, tre denti di *Sus scrofa*, due denti e un frammento di radio di *Ursus* sp., un dente di *Felis silvestris*, un frammento di tibia di *Equus ferus*, un frammento di emimandibola di *Alopex lagopus*, un dente e un frammento di tibia di carnivoro generico, una diafisi di tibia di un caprino, sette frammenti di ungulato provenienti da diversi distretti scheletrici mentre tutti gli altri resti sono classificati sotto l'etichetta generica di "indeterminati". Per quanto riguarda invece i frammenti calcinati,

degni di nota sono tre frammenti di *Castor fiber* provenienti dal carpo e dal metacarpo e la falange di *Canis Lupus*. Tutti gli altri elementi calcinati sono stati registrati come genericamente indeterminati, di questi, 383 sono frammenti diafisari, 121 epifisi e i restanti frammenti sono stati classificati come totalmente indeterminati.

Tracce antropiche in associazione a combustione sono state riscontrate su 36 frammenti combusti e un unico frammento indeterminato calcinato presenta dei cutmarks.

Per quanto riguarda i combusti, strie di macellazione si riscontrano per lo più su frammenti di diafisi indeterminate che, per questo motivo, sono difficili da contestualizzare e rendono complicato comprendere a quale fase del processamento della carcassa facciano riferimento. Interessanti i cutmarks registrati su un frammento di diafisi prossimale laterale di tibia di *Cervus elaphus*, come anche quelli individuati su un frammento di tibia di *Megaloceros giganteus*. Sul cavallo, specie molto rara al Riparo del Broion, sono state registrate delle strie in corrispondenza della diafisi medio-distale posteriore di una tibia destra; in base alle caratteristiche di queste strie, alla loro posizione e direzione, molto probabilmente il gesto può essere stato compiuto con l'obiettivo di distaccare le masse muscolari. Tracce di macellazione sono state individuate anche sul castoro, del quale si parlerà ampiamente in seguito. Per quanto riguarda i carnivori, sono da segnalare le strie sulla diafisi del radio destro di *Ursus arctos*.

In corrispondenza della diafisi di un ungulato è stato riconosciuto un incavo di impatto; in totale, 11 frammenti di diafisi hanno delle caratteristiche tali da poter essere classificati come coni di percussione che testimoniano la pratica della fratturazione delle ossa con l'obiettivo di recuperarne il midollo.

47 frammenti ossei non combusti presentano tracce lasciate dall'uomo durante varie fasi del processo di macellazione e sfruttamento delle carcasse. La maggior parte delle tracce antropiche si concentra su resti indeterminati (38.2%). Seguono poi quelle trovate sul castoro (23.4%), sugli ungulati (19.1%), sui cervidi (4.2%), sul cervo rosso (4.2%), sul megacero (4.2%), sulla iena (2.1%) e sui caprini (2.1%).

Prendendo in considerazione tutte le specie, la maggior parte delle strie individuate si concentrano sulle coste (17%), sulle ossa lunghe come femore e tibia (12.7%), metapodiali (6.3%) e coxali (4.2%).

La maggior parte dei frammenti ossei che presentano dei punti di impatto (6) sono da riferire a mammiferi indeterminati e sono localizzate soprattutto su porzioni diafisarie. 3 sono stati

individuati su un frammento diafisario di tibia di grande cervide come l'alce o il megacero (non è stato possibile identificare la specie), un altro su un radio di cervide e un altro ancora su una tibia di cervo rosso. Alto è invece il numero di coni di percussione registrati (58) identificati come frammenti diafisari di ungulati generici di medio/grande taglia. 7 frammenti diafisari sono stati riconosciuti come ritoccati, in quanto riportano una serie di impatti-depressioni circolari da ricondurre ad attività di ritocco. Per la maggior parte sono diafisi di mammiferi indeterminati, ma nel caso del femore di *Cervus elaphus* e di cervide, sono anche associati a strie (tabella 6).

RB US11 taxa	totale NISP	NR con strie	NR con PDI	NR con PDI e strie	cono di percussione	cono di percussione	ritoccatore/la vorato	totale antropico	% antropico	calpestio	NR con tracce carnivori	NR con tracce di roditori	NR combusti	NR combusti con strie
<i>Lepus europaeus</i>	1													
<i>Marmota marmota</i>	1													
<i>Castor fiber</i>	225	14						14	6.2				29	4
<i>Megaloceros giganteus</i>	11	3						3	27.2			1	2	1
<i>Alces alces</i>	2												1	
<i>Cervus elaphus</i>	17	3					1	4	23.5				2	1
<i>Capreolus capreolus</i>	5												2	
<i>Cervidae</i>	36	2	1				1	4	11.1					
<i>Bos/Bison</i>	2													
<i>Rupicapra rupicapra</i>	3													
<i>Caprinae</i>	4	1						1	25	1			1	
<i>Sus scrofa</i>	9												4	
<i>Equus ferus</i>	2	1						1	50					1
<i>Equus sp.</i>	1													
<i>Canis lupus</i>	7												3	
<i>Crocuta crocuta</i>	2													
<i>Vulpes sp.</i>	5													
<i>Felis silvestris</i>	1													
<i>Ursus arctos</i>	3	1						1	33.3	1			2	1
<i>Ursus spelaeus</i>	1													
<i>Ursus sp.</i>	7												1	
Ungulato	92	5				1	1	7	7.6	1				
Carnivoro	15	1			1			2	13.3				3	
tot. determinati	453	31	1		1	1	3	37	8.1	3		1	50	8
%	100	6.8	0.2		0.2	0.2	0.6	8.1						
frammenti indeterminati	21711	16	3		47	4	1	71	0.3	3	1		636	6
piccola taglia	134	2						2	1.4			1	8	1
media-piccola taglia	8	1						1	12.5					1
media taglia	9	1						1	11.1				1	
media-grande taglia	56	2			3	1		6	10.7	1			2	
media/grande taglia	18				1			1	5.5	1			2	

grande taglia	111	5		10		3	18	16.2	1	2		5	2
tot. indeterminati	22162	27	3	61	5	4	100	0.45	6	3	1	654	10

Tabella 6. Tabella riassuntiva delle tracce antropiche di macellazione e/o sfruttamento della carcassa dei vari taxa anche in associazione a combustione dell'US 11 del Riparo del Broion (RB).

2.3.1.2 Sfruttamento del castoro nell'US11 del Riparo del Broion

Lo studio dello sfruttamento e del trasporto della carcassa delle prede è stato possibile solamente per il castoro, del quale sono stati identificati un numero significativo di resti (225), mentre per gli altri taxa non vi sono elementi sufficienti per l'analisi.

Tale indagine oltre al numero degli elementi identificati per ogni specie (NISP), alla stima del numero minimo degli individui (NMI) e dell'età, si basa anche sul calcolo del numero minimo degli elementi (NME) (Binford 1978; Lyman 1994). È stato poi calcolato il coefficiente di sopravvivenza, che risulta dal rapporto tra numero minimo degli elementi (NME) e il numero degli elementi attesi (NEA) e anche l'indice di frammentazione calcolato dividendo il numero minimo degli elementi (NME) per il NISP (tabella 7).

Complessivamente sono stati individuati 225 elementi scheletrici da riferire al castoro, tra cui quelli meglio rappresentati sono le coste, le falangi (III in particolare), i metatarsali e i denti. Le ossa lunghe non sono molto rappresentate. Le scapole, lo sterno e le clavicole risultano abbastanza rare, mentre più rappresentate sono le vertebre, in particolare quelle caudali. Alcune ossa come l'astragalo, il calcagno e le ossa del tarso risultano del tutto assenti. Complessivamente, la porzione scheletrica più rappresentata è quella assiale (tronco), in quanto sono stati riconosciuti 116 frammenti di coste; mentre quella che risulta meno rappresentata (NISP=15) è la porzione degli arti anteriori dell'animale, dato perfettamente coerente con i resti ritrovati e identificati come facenti parte degli arti posteriori (NISP=16) del castoro. Il NME permette di valutare in modo più esatto la composizione del campione osteologico e di controllare sia la variabile della fratturazione differenziata delle diverse ossa sia quella della maggiore ricorrenza di alcuni elementi nello scheletro. L'indice di frammentazione (NME/NISP) mostra che gli elementi anatomici sottoposti alla frammentazione più alta sono i denti, con un valore di 0.26; anche le coste risultano particolarmente frammentate, con un valore di 0.29. In questo indice più il valore tende a 0, maggiore è il grado di frammentazione, più si avvicina a 1, maggiore è il grado di completezza dell'elemento osseo. Il valore di fratturazione dell'ulna (0.75) è legato a quello del radio (1) ma anche alla sua maggiore fragilità e quello del

coxale dipende molto dalla sua morfologia articolata (0.4). Anche la fibula, con lo 0.66, rientra nel gruppo di elementi a forte frammentazione, anche per la sua conformazione particolarmente sottile. Praticamente intatte risultano in generale le ossa di piccole dimensioni come le falangi.

La presenza nel giacimento delle ossa dell'intera carcassa può essere verificata e controllata valutando il numero di elementi attesi (NEA) nel record faunistico, calcolato in base al NMI, tenendo conto della differente quantità di ossa che compongono uno scheletro intero e calcolando l'indice di sopravvivenza delle ossa (NME/NEA). Gli elementi meglio documentati sono il cranio (0.33) e l'emimandibola (0.25) ma risultano ben rappresentate rispetto agli elementi attesi anche alcune ossa lunghe, quali ulna e tibia con valore di 0.25 seguiti da femore e radio con 0.16. Meno rappresentate risultano le falangi con valori tra lo 0.04 e lo 0.05. Scapole, clavicole, ossa carpali e metacarpali risultano nettamente sottorappresentati rispetto agli individui calcolati (tabella 7).

Elementi anatomici <i>Castor fiber</i>	NISP	NME	NEA	Indice di sopravvivenza (%) NME/NEA	Indice di frammentazione (%) NME/NISP
Cranio	5	2	6	0.33	0.4
Emimandibola	4	3	12	0.25	0.75
Denti indet.	34				
Ioide			6		
Totale craniale	43	5	24	0.2	0.11
Atlante-epistrofeo			12		
Vertebre	3	3	282	0.01	1
Vertebre caudali	5	5	126	0.03	1
Coste	116	34	168	0.2	0.29
Sterno	1	1	6	0.16	1
Clavicole	1	1	12	0.08	1
Coxale	5	2	12	0.16	0.4
Baculum			6		
Totale assiale	131	46	624	0.07	
Scapole	1	1	12	0.08	1
Omero	1	1	12	0.08	1
Radio	2	2	12	0.16	1
Ulna	4	3	12	0.25	0.75
Carpali	4	4	96	0.04	1
Metacarpali	3	3	60	0.05	1
Totale arti frontali	15	14	204	0.06	0.93
Femore	2	2	12	0.16	1
Patella					
Tibia	3	3	12	0.25	1
Fibula	3	2	12	0.16	0.66
Calcagno			6		
Astragalo			6		
Tarsali			60		
Metatarsali	8	7	60	0.11	0.87
Totale arti posteriori	16	14	168	0.08	
Metapodiali	2				

Prima falange	6	6	120	0.05	1
Seconda falange	5	5	120	0.04	1
Terza falange	7	7	120	0.05	1
Sesamoidi					
Totale arti distali	20	19	360	0.05	0.95
TOTALE	225	98	1380	0.07	0.43

Tabella 7. NISP (numero dei resti identificati), NME (numero minimo degli elementi), NEA (numero degli elementi attesi), Indice di sopravvivenza e di frammentazione di *Castor fiber* dell'US11 del Riparo del Broion (RB).

Lo studio delle tracce di sfruttamento della carcassa di castoro è stato effettuato su 225 resti. I reperti sono stati tutti osservati allo stereomicroscopio per discriminare le tracce di origine antropica da quelle di altra natura (Shipman 1981; Shipman, Rose 1984, 1985; Morlan 1984; Lyman 1994; Fisher 1995). Vengono considerate tracce di macellazione i tagli singoli o multipli effettuati con uno strumento litico per spellare, disarticolare e recuperare la carne. Complessivamente tali tracce sono state riscontrate su 15 reperti pari al 6.6 % del NISP. Le strie sono state riconosciute soprattutto su coste (10), coxale (1), falange I (1), metatarso (2) e tibia (1) (figura 9). In particolare, le tracce riscontrate sul frammento di costa (RB27) e sul frammento di metatarso (RB315) possono essere ricondotte all'azione di spellamento effettuata dall'uomo per togliere la pelle del castoro.

Infine, sono stati registrati 30 frammenti ossei combusti ascrivibili a diversi distretti scheletrici dell'animale (vertebre, ossa lunghe, coste, ossa del carpo e del tarso) (figura 9) e 2 frammenti di carpo e uno di metacarpo risultano invece calcinati, cioè presentano una colorazione bianca per effetto di una prolungata esposizione al fuoco. Per alcuni frammenti combusti (4) soprattutto coste, la combustione è associata a tracce di macellazione che insieme avvalorano l'ipotesi di un consumo da parte dei Neanderthal di questo roditore.



© 2003 ArcheoZoo.org / Michel Coutureau (Inrap)
D'après : Pales (Léon), Garcia (Michel A.). — *Atlas ostéologique pour servir à l'identification des Mammifères du Quaternaire - Carnivores/Homme*. Paris : CNRS éditions, 1981, pl. 20.

Figura 9. Ossa di *Castor fiber* con tracce di origine antropica e di combustione dall'US11. a) epifisi prossimale di metatarso II con tracce di macellazione.; b) frammento di costa prossimale con relativo ingrandimento delle strie; c) frammento di coxale con relativo ingrandimento dei cutmarks e dell'incavo di percussione; d) frammento di costa con relativo ingrandimento dei cutmarks e della porzione combusta.

2.3.2 Livello uluzziano US1g e 1f

Insieme faunistico

Dei 12125 resti, soltanto 185 sono stati identificati a livello tassonomico, di conseguenza è stato possibile determinare soltanto l'1.5 % dei resti. Nei casi in cui non è stato possibile risalire alla specie, si è registrata solamente la probabile dimensione del mammifero. In generale, l'assemblaggio faunistico non appare molto variegato: la specie più rappresentata in questi livelli è l'*Ursus* sp. (NISP=25); si registra poi la presenza di ungulati di media/grande taglia come *Sus scrofa* (NISP=11), *Cervus elaphus* (NISP=7) e *Capreolus capreolus* (NISP=6). Alcune specie di piccole dimensioni sono rappresentate da pochissimi resti come *Lepus* sp. (NISP=1), *Vulpes vulpes* (NISP=3), *Mustela erminea* (NISP=1) e *Felis* sp. (NISP=1). Anche la presenza di *Canis lupus* non è abbondante (NISP=2). Nella categoria delle specie più grandi, scarsi sono i frammenti di *Alces alces* (NISP=2), *Megaloceros giganteus* (NISP=2) e *Bos/Bison* (NISP=2). Nel gruppo dei roditori-lagomorfi soltanto un resto di *Lepus* sp. è stato individuato e anche tra i mustelidi è stato identificato soltanto un premolare inferiore attribuito a *Meles meles* (tabella 8, figura 10).

Taxa	RB US1g e 1f		
	NISP	%	NMI
<i>Lepus</i> sp.	1	0.5	1
Totale Lagomorpha e Rodentia	1	0.5	1
<i>Canis lupus</i>	2	1	2
<i>Vulpes vulpes</i>	3	1.6	1
<i>Ursus arctos</i>	3	1.6	1
<i>Ursus spelaeus</i>	9	4.8	2
<i>Ursus</i> sp.	25	13.5	2
<i>Meles meles</i>	1	0.5	1
<i>Felis</i> sp.	1	0.5	1
<i>Carnivora indet.</i>	11	5.9	1
Totale Carnivora	55	29.7	11
<i>Sus scrofa</i>	11	5.9	4
<i>Megaloceros giganteus</i>	2	1	1
<i>Alces alces</i>	2	1	1
<i>Cervus elaphus</i>	7	3.7	2
<i>Capreolus capreolus</i>	7	3.7	2
<i>Cervidae indet.</i>	10	5.4	2
<i>Bos/Bison</i>	2	1	1
<i>Capra ibex</i>	2	1	2
<i>Ungulata indet.</i>	86	46.4	
Totale Ungulata	129	69.7	15
Totale NISP	185	100	27
mamm. piccola taglia	11	0.09	
mamm. medio-piccola taglia	2	0.01	
mamm. media taglia	6	0.04	
mamm. media-grande taglia	32	0.2	

mamm. media/grande taglia	25	0.2
mamm. grande taglia	38	0.3
mamm. taglia indeterminata	11826	97.5
Tot. mamm. indeterminati	11940	98.4
TOTALE NR	12125	100
Frammenti combusti	2374	59.3
Frammenti calcinati	1627	40.6
Totale combusti	4001	100

Tabella 8. Numero di resti identificati (NISP) dell'unità stratigrafica 1g del Riparo del Broion (RB).

Al fine di valutare l'abbondanza delle specie nell'US1g, è stato calcolato oltre al NISP, anche la stima del numero minimo degli individui (NMI) (Bökönyi, 1970).

Lagomorfi e roditori

Leporidae

Lepus sp.: è stata registrata la presenza di un unico resto ascrivibile a questa specie, un calcagno appartenente, in base alle caratteristiche del reperto, a un individuo adulto. Di conseguenza l'NMI per questa specie è 1.

Carnivori

Canidae

Canis lupus: sono stati registrati due frammenti riferibili a questa specie, un dente e un sesamoide. In base alle caratteristiche di questi elementi, è stata stimata la presenza di due individui, un adulto e un giovane rappresentato dal premolare deciduo rilevato in corso di scavo (Ril.1248).

Vulpes vulpes: sono stati individuati tre resti ascrivibili a questo animale, due denti e una falange. In base a questi elementi scheletrici ritrovati è plausibile ipotizzare la presenza di un individuo adulto di *Vulpes vulpes*.

Ursidae

Ursus spelaeus: per quanto riguarda l'*Ursus spelaeus* sono stati individuati 8 resti da riferire a diversi distretti scheletrici (omero, vertebra, falange, femore e un dente) che testimoniano la presenza di due individui adulti che si differenziano tra di loro per la taglia, (nello specifico, il frammento Ril.1404 rappresenta l'individuo di taglia inferiore).

Ursus arctos: sono state registrate tre falangi prime. Dai resti a disposizione si può stimare la presenza di un individuo adulto.

Ursus sp.: vanno ad aggiungersi ai resti appena descritti anche 35 reperti non meglio identificati come *Ursus* sp., in quanto per le loro caratteristiche morfometriche e per la loro frammentarietà non permettono una distinzione precisa tra lo *spelaeus* e l'*arctos*. Si tratta di 9 sesamoidi, 3 falangi II, 2 frammenti di mandibola, 1 frammento di craniale, 1 metapodiale, 2 metacarpi, 1 metatarso e infine 4 denti (un canino, un premolare, un incisivo e un molare).

Mustelidae

Meles meles: è stato determinato un solo resto appartenente a questa specie, un premolare IV inferiore; di conseguenza, il numero minimo stimato per questa specie è 1.

Ungulati

Artiodactyla

Suidae

Sus scrofa: è stato possibile individuare 10 frammenti ossei attribuibili a questa specie. Si tratta per lo più di denti e di 2 falangi (I e III). Trattandosi di frammenti dentari è stato possibile ottenere informazioni anche sull'età degli individui analizzando il grado di usura e di eruzione dentaria. In base a questo è stato stimato un numero minimo di 4 individui. Un giovane rappresentato da RB457, un altro giovane rappresentato da RB445 e RB474 di taglia più piccola rispetto al precedente, un giovane-adulto rappresentato da RB473, Ril.1669 e RB446 di taglia più grande degli altri due e un adulto rappresentato dal reperto Ril.3013.

Cervidae

Megaloceros giganteus: sono stati identificati soltanto due frammenti appartenenti a questa specie. Nello specifico si tratta di due frammenti di tibia, un'epifisi distale e un frammento di diafisi prossimale. In base a questi elementi, il numero minimo è stato stimato a un individuo adulto.

Cervus elaphus: nel livello uluzziano sono stati registrati 7 resti di *Cervus elaphus*, un unico dente e diversi frammenti diafisari di metapodiali, di un femore e di un radio. In base a questi reperti, il numero minimo degli individui è stato stimato a 2: un giovane inferiore ai 3 anni rappresentato da Ril.1555 e Ril.3132 e un individuo adulto rappresentato da Ril.1381, Ril.3054, Ril.3009 e Ril.1607.

Alces alces: sono stati registrati due frammenti appartenenti a questa specie (un frammento di diafisi di omero e una falange I). Considerando questi resti, il numero minimo degli individui è stato stimato a 1.

Capreolus capreolus: è stato possibile identificare 6 frammenti diafisari di metatarso, due frammenti di radio e un molare inferiore attribuibili a questa specie. In base agli elementi a disposizione, è stata stimata la presenza di 2 individui all'interno del livello uluzziano; un adulto rappresentato da Ril.1442, RB403 e RB409 e un altro adulto ma di taglia inferiore, rappresentato da Ril.1321 e Ril.3028.

Cervidae: sono stati inseriti in questa categoria tutti quegli elementi scheletrici che non è stato possibile assegnare al *Cervus elaphus*, ad *Alces alces* o al *Megaloceros giganteus*. Per questa categoria sono stati stimati due individui: un individuo neonatale rappresentato da Ril.978 e Ril.1419 e un individuo adulto rappresentato da Ril.1646 e Ril.1392. I reperti assegnati a questa categoria sono per lo più frammenti diafisari di ossa lunghe come tibia e femore e di metapodiali.

Caprinae

Capra ibex: all'interno di questa categoria sono stati registrati soltanto due resti riferibili allo stambecco. In particolare, sono stati individuati un premolare deciduo superiore destro e un frammento di epifisi distale di femore sinistro. In base a questi reperti, il numero minimo degli individui è stato stimato a 2, un individuo giovane, rappresentato dal premolare e un individuo adulto rappresentato invece dal femore.

Bos/Bison: rientrano in questa categoria tutti i resti di cui non è stato possibile discriminare l'appartenenza al *Bison* o al *Bos* data l'assenza di elementi o porzioni anatomiche discriminanti. Sono stati identificati due elementi diafisari ascrivibili uno ad una tibia e l'altro a un metatarso; in base a questi elementi, il numero minimo di individui è stato stimato a 1.

Felidae

Felis sp.: un unico elemento è stato identificato come appartenente a questa specie, un frammento di una radice di un canino che testimonia la presenza di un unico individuo.

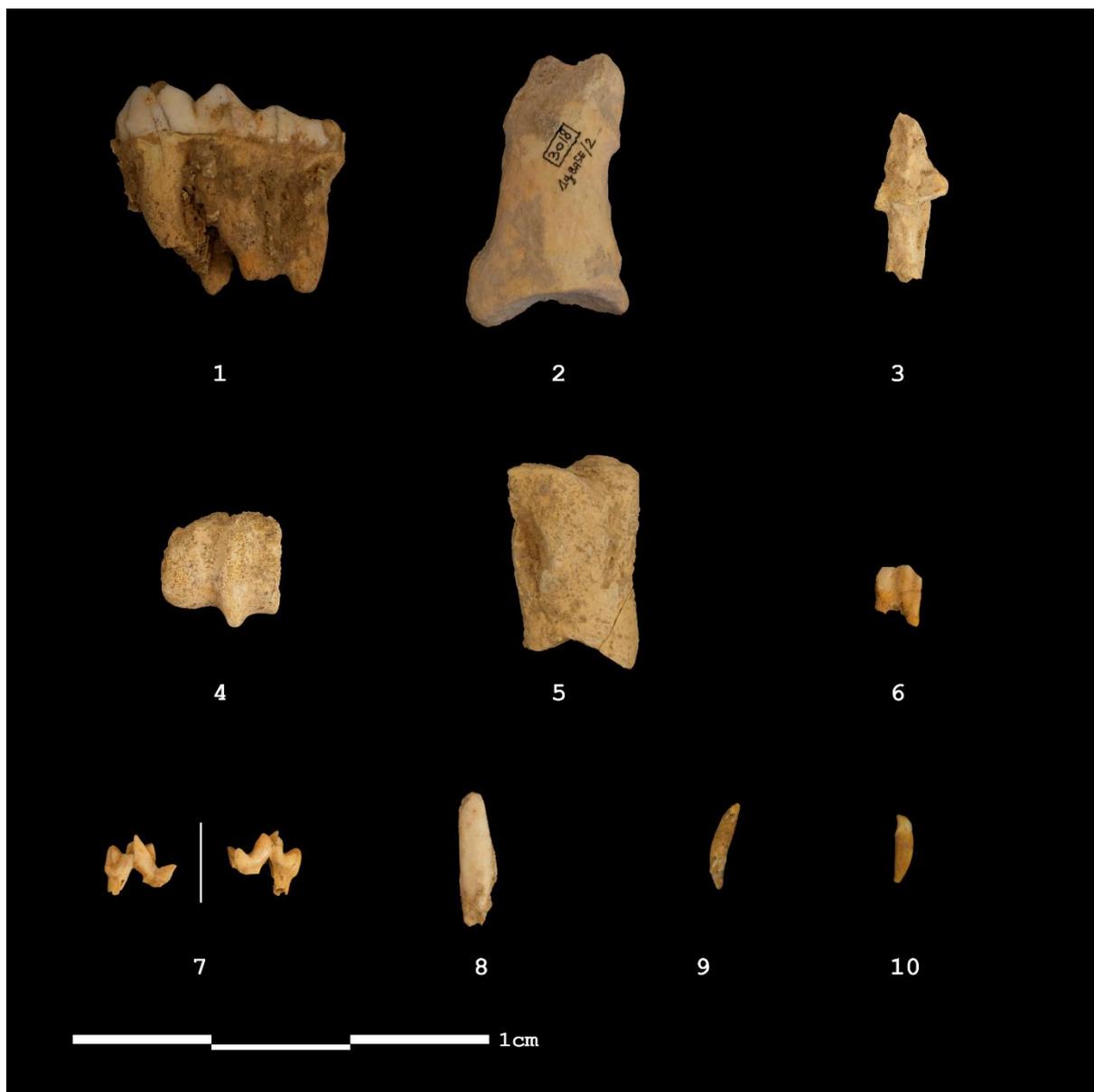


Figura 10. Alcuni resti di mammiferi determinati dall'US1g. 1) *Ursus spelaeus*. LM₃. 2) *Ursus spelaeus*. Falange I. 3) *Lepus europaeus*. Calcagno. 4) *Cervus elaphus*. Epifisi distale metapodiale. 5) *Alces alces*. Falange I. 6) *Capreolus capreolus*. Mi_{inf.} 7) *Canis lupus*. p₄. 8) *Sus scrofa*. Incisivo mediano. 9) *Vulpes vulpes*. I₃. 10) *Vulpes vulpes* I₃.

2.3.2.1 Risultati analisi tafonomiche US1g e 1f

Modificazioni non antropiche

L'insieme dei resti risulta fortemente frammentato, il 96.9 % dei frammenti risulta essere inferiore ai 3 cm. Tra gli agenti naturali che hanno influenzato e caratterizzano contemporaneamente anche più di una superficie delle ossa prese in esame, gli apparati radicali hanno agito soltanto sullo 0.9 % dei resti, il 23.5 % presenta delle concrezioni, meno di dieci reperti presentano esfoliazioni sulla superficie e appaiono arrotondati come per effetto della fluitazione dell'acqua. L'1.5 % dei resti presenta delle caratteristiche tali da far pensare all'azione di una corrosione. L'agente tafonomico naturale più presente è di certo il manganese, registrato sul 29.9 % dei resti.

Modificazioni antropiche

I reperti combusti registrati per l'US1g e 1f sono 4001 pari al 32.8 % dell'intero campione analizzato. In particolare, 2374 risultano soltanto combuste, quindi presentano una colorazione che va dal marrone al nero e 1627 invece risultano calcinate.

Nella totalità degli elementi combusti (NR 4001), sono stati individuati due sesamoidi di *Ursus* sp. e un frammento diafisario di ungulato. Per tutti gli altri frammenti combusti, non è stato possibile effettuare una determinazione tassonomica, risultando quindi indeterminati. Sono stati però registrati 396 frammenti di epifisi e 140 di diafisi. Per quanto riguarda i calcinati, un unico frammento è stato determinato come epifisi distale di radio di *Capreolus capreolus*, per il resto, tutti gli altri frammenti ossei calcinati, o perché troppo frammentati o a causa delle modificazioni dovute al fuoco risultano indeterminati (NR 1626). Nello specifico, 131 resti sono stati riconosciuti come diafisi, 254 come epifisi, mentre il resto risulta completamente indeterminato.

Sono state riscontrate pochissime tracce antropiche in associazione a combustione: in totale, tra resti combusti e calcinati, sono solo 3 (2 combusti e 1 calcinato). Degni di nota, i cutmarks individuati sul sesamoide combusto di *Ursus* sp. che sembrano essere legati all'azione di spellamento. Tra i calcinati è presente anche un cono di percussione che attesta la pratica della fratturazione delle ossa per il ricavo del midollo osseo.

Per quanto riguarda i reperti non combusti, soltanto 19 resti presentano tracce lasciate dall'uomo durante varie fasi del processo di macellazione e sfruttamento delle carcasse. La

maggior parte delle tracce antropiche si concentra su resti indeterminati (68.4 %) e sugli ungulati (10.5 %), su un frammento di cervidae e sulla fossa masseterica di un'emimandibola sinistra di *Ursus sp.* testimoniando la pratica venatoria nei confronti di questo animale (tabella 9).

RB US1g taxa	totale NISP	NR con strie	NR con PDI	NR con PDI e strie	cono di percussione	cono di percussione non etria	ritoccatore/la vorato	totale antropico	% antropico	calpestio	NR con tracce	NR con tracce di	NR combusti	NR combusti con strie
<i>Lepus europaeus</i>	1													
<i>Megaloceros giganteus</i>	2													
<i>Alces alces</i>	2		1					1	50					
<i>Cervus elaphus</i>	7												1	
<i>Capreolus capreolus</i>	7												1	
<i>Cervidae</i>	10	1	2					3	30					
<i>Bos/Bison</i>	2													
<i>Capra ibex</i>	2													
<i>Sus scrofa</i>	11												1	
<i>Canis lupus</i>	2													
<i>Vulpes vulpes</i>	3													
<i>Felis sp.</i>	1													
<i>Ursus arctos</i>	3													
<i>Ursus spelaeus</i>	9													
<i>Ursus sp.</i>	25	2	1					3	12				1	1
<i>Meles meles</i>	1													
Ungulato	86	2			12		2	16	18.6				1	
Carnivoro	11													
Tot. determinati	185	5	4		12		2	23	92				5	1
%	100	2.7	2.1		6.4		1	12.4						
frammenti indeterminati	12125	5	2		22			29	0.2				3988	1
piccola taglia	11													
media-piccola	2	1						1	50					1
media taglia	6													
media-grande taglia	32				1			1	3.1	1			5	
media/grande taglia	25	2			1			3	12		1		1	
grande taglia	38		1	5				6	15.7					
totale indeterminati	11826	8	3	5	24			40	0.3	1	1		5	2

Tabella 9. Tabella riassuntiva delle tracce antropiche di macellazione e/o sfruttamento della carcassa dei vari taxa anche in associazione a combustione dell'US1g del Riparo del Broion (RB).

2.4 Risultati analisi proteomiche (ZooMS)

2.4.1 Unità stratigrafica musteriana US11

Dei 58 campioni analizzati, 14 non hanno fornito nessuna informazione tassonomica. 20 sono stati determinati come generici ungulati perché non sono stati individuati i peptidi che permettono di discriminare cervidi, bovidi e caprini che, in questo contesto, in base alle analisi archeozoologiche del record faunistico, potrebbero essere o camosci o stambecchi. 3 campioni sono stati classificati come carnivori e 5 come cervidi (figura 11). Per i restanti campioni (5), è stato possibile risalire anche al livello della specie: 1 *Bos/Bison* e 3 *Ursus* sp. (figura 11 e tabella 10). I risultati forniti dalla ZooMS sono in linea con la composizione della fauna ottenuta tramite le analisi morfologiche dei frammenti ossei che delineano un livello caratterizzato da una prevalenza di ungulati sui carnivori, dove tra gli ungulati, la categoria più numerosa è quella dei cervidi. Tra i campioni selezionati per le analisi ZooMS ci sono anche due frammenti ossei che presentano delle tracce di macellazione: RB160 e RB55. Purtroppo, il primo non ha fornito informazioni tassonomiche ma RB55, è risultato essere un carnivoro, confermando le ipotesi effettuate in fase di selezione del frammento.

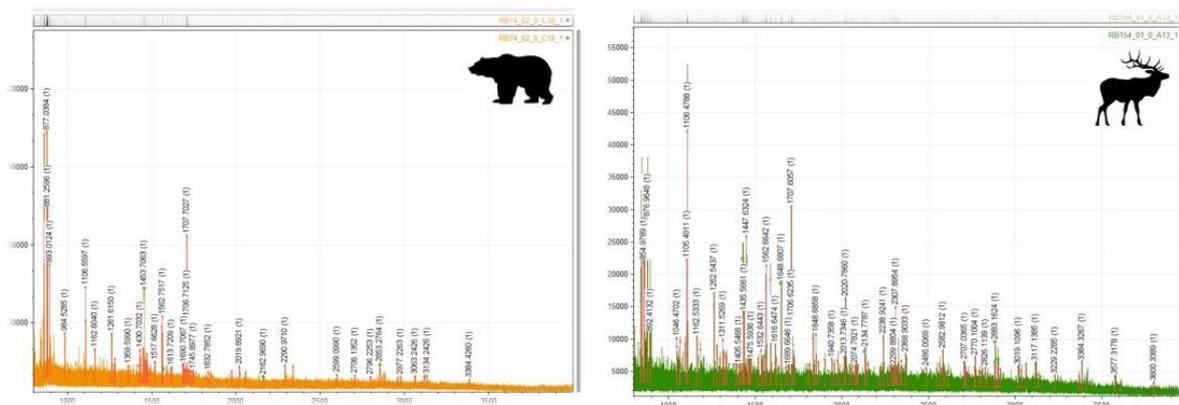


Figura 11: Spettro del campione RB74 determinato come *Ursus* sp. e spettro di RB154 determinato come *Cervidae*.

Considerando tutti i campioni dell'US11 analizzati, il peptide 1105.6 è presente nel cromatogramma di 34 campioni e in tutti risulta essere particolarmente deamidato. Tale informazione ci fornisce la firma dell'autenticità dei risultati, dandoci anche delle indicazioni sulla qualità del collagene presente all'interno dei campioni. In generale, nonostante si tratti di un contesto del Nord Italia, le analisi ZooMS non sono state molto risolutive, poiché molti campioni non avevano collagene sufficiente per poter effettuare una discriminazione tassonomica. Probabilmente i diffusi fenomeni di bioturbazione riscontrati in tutto lo strato e le

strutture di combustione rilevate, possono aver contribuito all'attivazione di fenomeni diagenetici che hanno compromesso la preservazione della componente organica delle ossa.

ID. Lab	P1	A	A'	B	C	P2	D	E	F	F'	G	G'	identificazione ZooMS
RB55	1105.6			1453.7	1566.8	1649.8			2853.4				Carnivora
RB56	1105.6			1453.7			2163.1	2808.3	2853.4				<i>Ursus</i> sp.
RB74	1105.6			1453.7	1566.8		2163.1	2808.3	2853.4	2869.4			<i>Ursus</i> sp.
RB101	1105.6			1427.7									Ungulata
RB105	1105.6			1427.7									Ungulata
RB107	1105.6												no determinazione
RB109	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1						Ungulata
RB115	1105.6			1453.7	1566.8		2163.1	2808.3	2853.4		2957.5		<i>Ursus</i> sp.
RB132													no determinazione
RB136				1427.7									Ungulata
RB138	1105.6			1453.7					2853.4				Carnivora
RB141	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4	2899.4			Cervidae
RB151	1105.6			1427.7		1648.8			2883.4				<i>Ovis-Caprinae/Cervidae</i>
RB154	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4	2899.4			Cervidae
RB156	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1		2883.4				<i>Ovis-Caprinae/Cervidae</i>
RB160													no determinazione
RB167	1105.6												no determinazione
RB170	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8	2131.1		2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RB177	1105.6												no determinazione
RB178	1105.6												no determinazione
RB184	1105.6			1427.7									Ungulata
RB190													no determinazione
RB208				1427.7									Ungulata
RB214	1105.6			1427.7									Ungulata
RB223	1105.6			1427.7									Ungulata
RB232				1427.7									Ungulata
RB237	1105.6												no determinazione
RB251	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8							Cervidae
RB254	1105.6			1427.7		1648.8			2883.4	2899.4			<i>Ovis-Caprinae/Cervidae</i>
RB257				1427.7		1648.8							Ungulata
RB258													no determinazione
RB262	1105.6			1427.7		1648.8							Ungulata
RB265	1105.6			1427.7		1648.8							Ungulata
RB377	1105.6			1427.7									Ungulata
RB399													no determinazione
RB409	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8							<i>Ovis-Caprinae/Bovidae</i>
RB410	1105.6			1453.7	1566.8				2853.4				Carnivora
RB412	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8							Cervidae
RB413	1105.6			1427.7									Ungulata
RB414	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4	2899.4			Cervidae
RB415	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1						Ungulata
RB416	1105.6												no determinazione
RB417													no determinazione
RB418	1105.6			1427.7		1648.8							Ungulata
RB437													no determinazione
RB453													no determinazione

Tabella 10. Marcatori peptidici individuati con le analisi ZooMS e determinazioni tassonomiche dei campioni dell'US 11 (+ sottounità) del Riparo del Broion (RB).

2.4.2 Livello uluzziano US1g e 1f

Dei 95 campioni analizzati dell'US1g (tabella 11), soltanto 13 non hanno restituito informazioni utili per la discriminazione tassonomica. Di 17 non è stato possibile distinguere tra cervide, caprino e bovide, per questo sono stati classificati o come ungulati generici oppure, quando è stato possibile escludere una specie, sono state riportate le due opzioni rimaste es. cervidae/caprinae. Sotto la classificazione generica di "cervidae" sono stati inseriti 16 campioni. In base alla composizione della fauna, all'interno di questa categoria potrebbero rientrare: *Alces alces*, *Megaloceros giganteus*, *Cervus elaphus* e *Capreolus capreolus*. Queste specie non possono essere distinte su base proteomica, ad eccezione del capriolo che ha due peptidi (G e G') diversi dalle altre 3 specie sopra menzionate, ma che non erano presenti all'interno degli spettri ottenuti. 24 frammenti ossei sono stati determinati come generici carnivori. Quando invece i campioni (7) presentavano soltanto un unico peptide (1453.7), comune a diverse specie (diversi carnivori, lepre e cinghiale), il frammento è stato rianalizzato morfologicamente a posteriori. Per questo tipo di determinazioni, per 5 campioni su 7 è stato possibile escludere, sulla base delle caratteristiche morfologiche, che si trattasse di un frammento di *Lepus* sp., prendendo in esame e rivalutando soprattutto la grandezza del reperto e lo spessore e la compattezza dell'osso. Per altri campioni troppo frammentati o che non fornivano indicazioni di nessun tipo, è stata lasciata la categoria "Carnivora/*Sus scrofa*/*Lepus* sp.". Un singolo campione è stato determinato come *Bos/Bison* (figura 12), dato coerente con le informazioni ricavate dalle analisi archeozoologiche; in effetti anche il territorio che circonda il riparo, non rispecchia molto l'ambiente in cui vive questo animale che ha bisogno di spazi aperti come le praterie. 14 frammenti ossei possiedono i peptidi caratteristici dell'*Ursus* sp., categoria ampiamente rappresentata nei livelli 1f e 1g del Riparo del Broion. Tramite le analisi del collagene però, non è possibile distinguere tra un frammento osseo appartenente a *Ursus* sp./*arctos* e *spelaeus*. Mentre di *spelaeus* non disponiamo dei peptidi all'interno del database di riferimento, per *Ursus* sp. e *arctos*, i peptidi sono gli stessi, motivo per cui si è deciso di classificarli tutti come generici (*Ursus* sp.). L'*Ursus* condivide la maggior parte dei suoi peptidi diagnostici con il *Felis* sp. e la *Lynx lynx*: quando non è stato possibile distinguerli sulla base dell'analisi del collagene, anche in questo caso il frammento osseo è stato rianalizzato morfologicamente, in modo da poter escludere una specie e arrivare ad una determinazione meno generica. Spesso è stato escluso il gatto selvatico per le sue caratteristiche dimensioni e per lo spessore della corticale che non erano compatibili con il frammento analizzato. Infine, sono stati determinati 7 campioni appartenenti alla specie *Sus scrofa* (figura 12), presente

anch'essa nel record faunistico dei livelli 1f e 1g. Anche per questa unità stratigrafica, è stata eseguita l'analisi su un campione che presentava delle strie (Ril.989). Tale campione è risultato essere un cervide, confermando quello che era già stato evidenziato dalle analisi archeozoologiche e cioè che questi animali venivano cacciati e consumati dagli uomini del tempo.

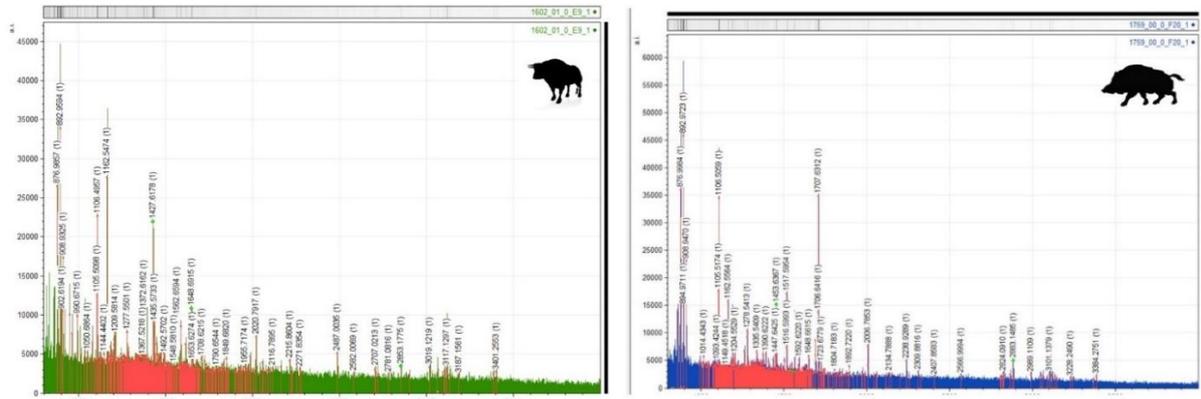


Figura 12. Spettro del campione Ril.1602 identificato come *Bos/Bison* e spettro del campione Ril.1759 identificato come *Sus scrofa*.

Considerando tutti i campioni dell'US1g analizzati, il peptide 1105.6 è presente nel cromatogramma di 92 campioni e in tutti risulta essere particolarmente deamidato. Questo dato ci fornisce la firma dell'autenticità dei risultati, ma indica anche che i campioni contengono collagene di discreta qualità e questo può essere utile in previsione di nuove e ulteriori analisi (come, ad esempio, il radiocarbonio e le analisi genetiche). In questo caso, le analisi ZooMS sono state utili perché hanno permesso di aggiungere molte informazioni sul contesto faunistico, aumentando in maniera consistente il NISP delle varie specie. Confrontando le due unità stratigrafiche prese in esame, si può notare che i livelli 1f e 1g hanno fornito molte più informazioni in termini tassonomici, molto probabilmente il collagene era più conservato rispetto all'US11 e relative sottunità.

Grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Chimica dell'Università di Bologna "Giacomo Ciamician", sono in corso le analisi di screening con microNIR e FTIR portatile su tutti i frammenti di cui è stato analizzato il collagene con la ZooMS delle due unità stratigrafiche (Musteriano e Uluzziano) del Riparo del Broion. Il microNIR è un nuovo strumento progettato per misurare la riflettanza diffusa nella regione NIR (cioè del vicino infrarosso) dello spettro elettromagnetico (O'Brien et al., 2012). Grazie alle sue piccole dimensioni può potenzialmente essere utilizzato anche direttamente sullo scavo archeologico per effettuare rapidamente e senza

distuggere il campione, una prima valutazione della preservazione del collagene nelle ossa. L'utilizzo di entrambi questi strumenti che analizzano zone spettrali diverse, permette di coprire un più ampio range e quindi individuare e intercettare (se presenti) le bande caratteristiche del collagene. L'obiettivo è quello di comparare i dati proteomici con quelli spettroscopici e comprendere se effettivamente la differenza tra le due unità analizzate in termini di possibilità di ottenere una determinazione tassonomica, può essere dovuta a una differenza nella conservazione e presenza di collagene. Grazie a questi strumenti, infatti, è possibile effettuare una valutazione del grado di conservazione e omogeneità del collagene nelle ossa all'interno e tra differenti strati presi in esame (Vincke et al., 2014). Diversi studi hanno applicato le analisi NIR alle ossa provenienti da contesti archeologici, mostrando che questa tecnica può fornire utili informazioni riguardo la natura di diversi tipi di sedimento e suolo (Linderholm & Geladi, 2012) e sulla storia diagenetica delle ossa (Thomas et al., 2011).

ID. Lab	P1	A	A'	B	C	P2	D	E	F	F'	G	G'	identificazione ZooMS
6	1105.6			1453.7	1566.8	1609.8	2163.1		2853.4			2873.5	<i>Ursus sp.</i>
7	1105.6			1453.7	1566.8				2853.4				Carnivora
16													no determinazione
18	1105.6												no determinazione
50	1105.6												no determinazione
61	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8			2883.4				Cervidae
62													no determinazione
67	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
74	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
80	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8			2883.4				Cervidae
86													no determinazione
105	1105.6			1453.7	1550.8		2131.1						<i>Sus scrofa</i>
108	1105.6												no determinazione
111	1105.6			1453.7	1550.8		2131.1						<i>Sus scrofa</i>
112	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
131	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae/ <i>Ovis-Caprinae</i>
146	1105.6			1453.7	1566.8								Carnivora
165	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
170													no determinazione
186	1105.6			1427.7		1648.8							Ungulata
196	1105.6			1427.7		1648.8			2883.4				Cervidae/ <i>Ovis-Caprinae</i>
201													no determinazione
285	1105.6												no determinazione
341	1105.6			1453.7	1566.8				2853.4				Carnivora
369	1105.6			1453.7	1566.8								Carnivora
410	1105.6			1427.7		1648.8			2883.4				<i>Ovis-Caprinae/Cervidae</i>
514													no determinazione
620	1105.6			1453.7					2853.4				Carnivora

1660	1105.6		1453.7					2853.4				Carnivora
1662	1105.6		1453.7	1566.8	1609.8	2163.1		2853.4				<i>Ursus sp.</i>
1684	1105.6		1427.7									Ungulata
1689	1105.6		1427.7		1648.8							Ungulata
1714	1105.6		1453.7		1609.8	2163.1		2853.4		2957.5		<i>Ursus sp.</i>
1734												no determinazione
1748	1105.6		1453.7	1566.8		2163.1		2853.4				<i>Ursus sp.</i>
1750	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
1759	1105.6		1453.7	1550.8		2131.1		2883.4				<i>Sus scrofa</i>
3008	1105.6		1453.7					2853.4				Carnivora
3024	1105.6		1427.7									Ungulata
3034	1105.6		1453.7	1566.8				2853.4				Carnivora
3047	1105.6		1453.7	1566.8	1609.8							<i>Lynx lynx/Ursus sp.</i>
3052	1105.6		1453.7									Carnivora/ <i>Lepus sp./Sus scrofa</i>
3060	1105.6		1453.7	1566.8				2853.4				Carnivora
3062	1105.6		1453.7	1550.8								<i>Sus scrofa</i>
3064	1105.6		1453.7	1566.8	1639/1649			2853.4				<i>Canis lupus/Crocuta crocuta</i>
3066	1105.6		1453.7	1566.8				2853.4				Carnivora
3071	1105.6		1453.7									Carnivora
3086	1105.6		1427.7		1648.8							Ungulata
3087	1105.6		1453.7	1566.8		2163.1		2853.4				<i>Ursus sp./Lynx lynx</i>
3088	1105.6		1427.7		1648.8	2131.1		2883.4	2899.4			<i>Capra ibex/Rupicapra rupicapra/cervidae</i>
3092	1105.6		1453.7	1566.8	1639.8							Carnivora
3109	1105.6		1427.7									Ungulata
3110	1105.6		1453.7									Carnivora
3115	1105.6		1453.7				2808.3					Carnivora
3121	1105.6		1453.7	1566.8		2163.1		2853.4				<i>Ursus sp.</i>

Tabella 11. Marcatori peptidici individuati con le analisi ZooMS e determinazioni tassonomiche dei campioni dell'US 1g e 1f del Riparo del Broion (RB).

2.5 Discussione

Dal punto di vista archeozoologico, confrontando i due livelli presi in esame è possibile delineare delle differenze nella composizione del record faunistico (figura 13). Molto evidente è l'assenza di resti appartenenti al castoreo per i livelli 1f e 1g, la cui presenza era invece preponderante nell'US11 e relative sottounità. Inoltre, rispetto all'US11, nei livelli uluzziani si nota una minore varietà di specie presenti nel campione faunistico, non sono stati registrati infatti resti di camoscio (*Rupicapra rupicapra*), di *Equus ferus*, di *Marmota marmota*, di *Alopex lagopus* e di *Crocuta crocuta*. Le uniche specie rilevate nell'US1g e non presenti nei livelli musteriani sono lo stambecco (*Capra ibex*) e il tasso (*Meles meles*). Un'altra differenza molto evidente è la diminuzione in termini quantitativi di resti rinvenuti nei livelli 1f e 1g delle specie

presenti in entrambi i livelli analizzati: di *Canis lupus* sono stati registrati soltanto 2 resti, mentre nell'US11 sono 7; del *Megaloceros giganteus* sono stati individuati molti meno resti (2 rispetto a 11 del livello musteriano) e anche del *Cervus elaphus* (da 17 a 7 resti). Per quanto riguarda i reperti identificati come *Capreolus capreolus* si registra una lieve diminuzione (da 7 a 5). Rimane costante la presenza di bovidi (NISP=2 in entrambi i livelli analizzati) e di *Alces alces* (NISP=2); mentre aumentano i resti ritrovati di *Sus scrofa* (da 9 a 10) e molto più consistente è l'aumento di resti ascrivibili a *Ursus* sp. (da 7 a 25).

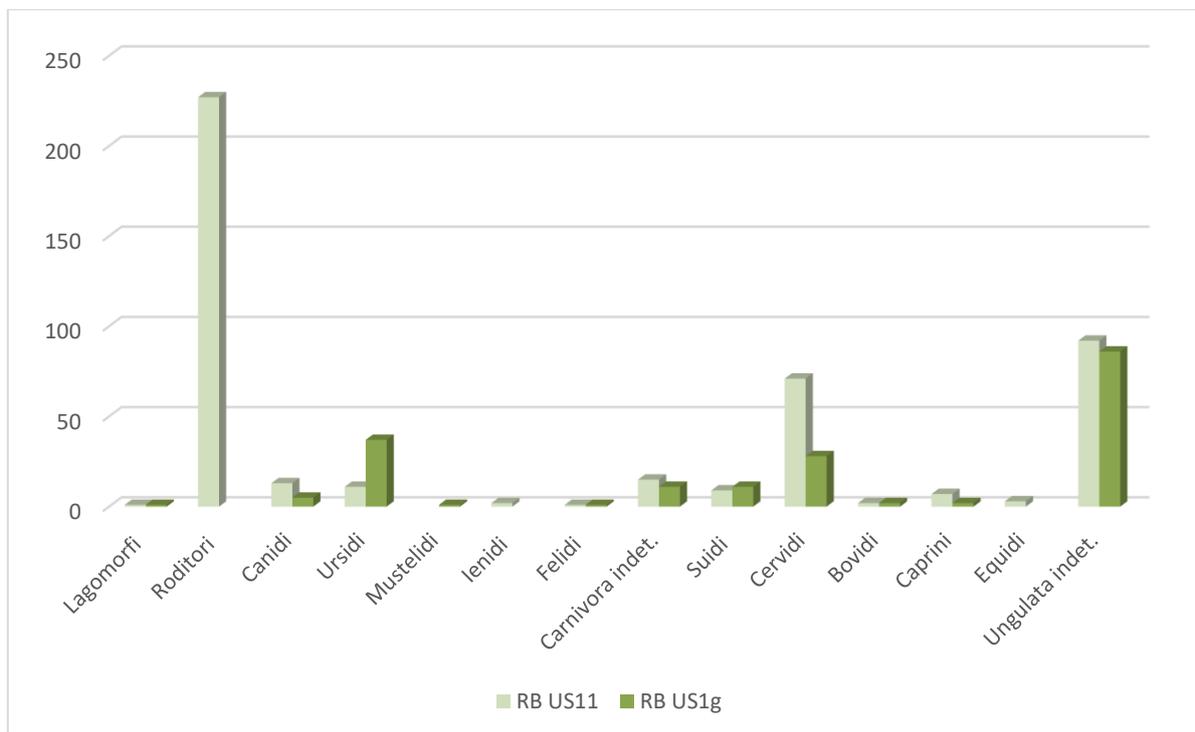


Figura 13. Confronto dati archeozoologici US11 (+ sottounità) e US1g e 1f del Riparo del Broion (RB).

In generale, nell'US1g si riscontra un aumento della componente carnivora nel record faunistico (figura 14) dovuto soprattutto ai molti reperti di *Ursus* sp., *Ursus spelaeus* e di carnivori generici identificati. Almeno in parte, questo dato deve essere ponderato e calibrato sulla base del criterio di selezione adottato per questo contesto: nello scegliere i campioni da sottoporre alle analisi proteomiche, oltre ai frammenti ossei indeterminati, è stata data la priorità a quei reperti che presentavano delle caratteristiche tali da poter essere dei probabili frammenti umani. La selezione iniziale ha tenuto quindi conto della maggiore densità e spessore delle ossa corticali animali (White & Folkens, 2005; Dupras et al., 2012; Christensen et al., 2014) e della loro minore porosità rispetto a quelle umane (Croker et al., 2016; O'Brien 2019). Un altro

elemento di cui si è tenuto conto è l'assenza di trabecole sulla superficie interna di gran parte delle diafisi delle ossa animali, risultando in una superficie midollare molto liscia rispetto a quella umana (Watson & McClelland, 2018).

Rispetto ad una diafisi di un ungulato, quella di un carnivoro è caratterizzata da una maggiore porosità che la rende molto meno liscia e regolare e dalla presenza più estesa di trabecole sulla superficie midollare, per questo la selezione iniziale ha in qualche modo escluso la maggior parte degli ungulati per concentrarsi soprattutto sui frammenti ossei di carnivoro/possibile *Homo*.

Come è possibile notare dal grafico, la componente dei roditori, così consistente nell'US11 diventa praticamente impercettibile nel livello uluzziano. Una costante in entrambi i livelli analizzati è la presenza massiccia degli ungulati.

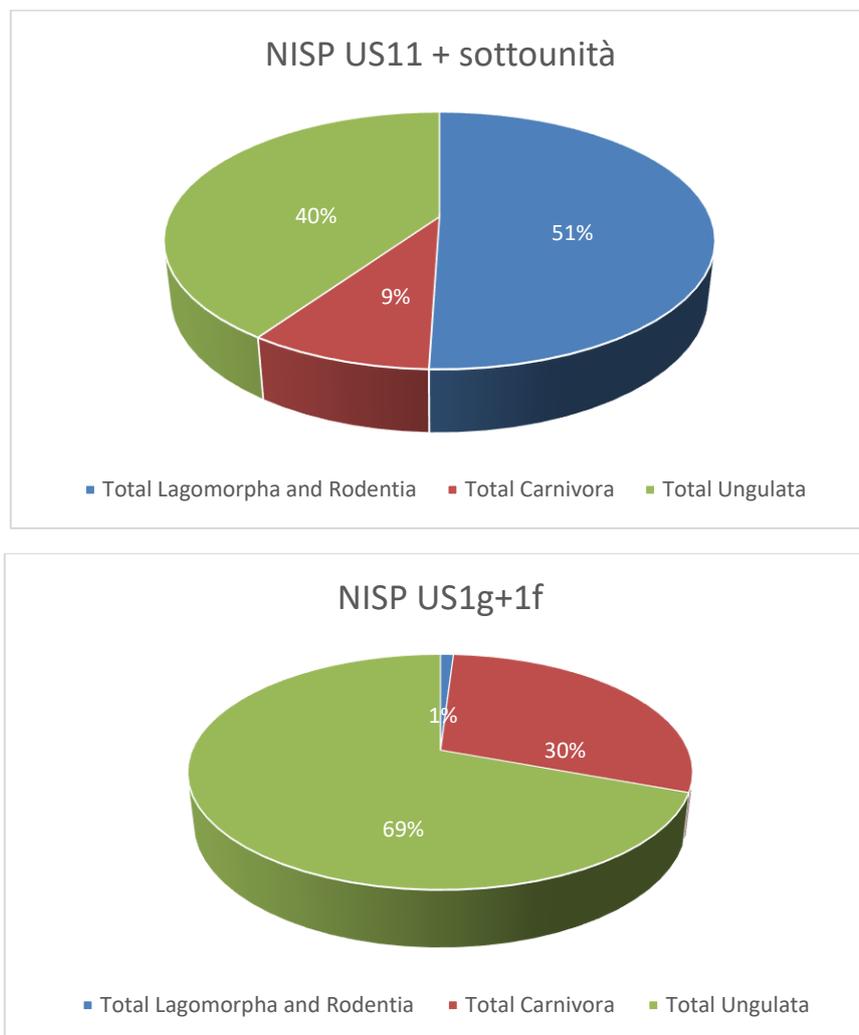


Figura 14. Confronto NISP ottenuto dalle analisi morfologiche dei livelli 1g e 1f e US11+ rispettive sottounità del Riparo del Broion (RB).

Analizzando e confrontando i risultati ZooMS tra i due livelli di frequentazione, i livelli uluzziani risultano meglio conservati in termini di collagene rispetto all'US11 che di conseguenza fornisce meno indicazioni tassonomiche sui frammenti analizzati. Per quanto riguarda i campioni che sono stati determinati come *Ursus* sp., rimane costante il rapporto tra le due US (NISP US11:3 – NISP liv.1g+1f: 13), così come era stato delineato con le analisi morfologiche (NISP US11: 7 – NISP liv.1g+1f: 25). Interessante sottolineare che per l'US1g sono stati identificati 7 resti di *Sus scrofa* e nemmeno uno nell'US11. Il rapporto della quantità di cervidi nelle due US invece viene ribaltato: tramite le analisi archeozoologiche erano stati identificati molti più resti di cervidi nel livello musteriano rispetto a quello uluzziano. Tramite la ZooMS questo rapporto viene invertito, ma il risultato potrebbe essere spiegato e in qualche modo “condizionato” dalla scarsa o minore preservazione del collagene nel livello musteriano rispetto a quello uluzziano. Interessante infine notare come la presenza costante e molto ridotta di *Bos/Bison*, sia tale sia nelle analisi morfologiche che proteomiche.

Confrontando infine il totale del NISP ottenuto con le determinazioni tramite archeozoologia tradizionale e quello della ZooMS (figura 15), si può notare che per alcune categorie è stato possibile implementare discretamente la quantità dei frammenti identificati: è il caso dei carnivori generici ma anche e soprattutto dell'*Ursus* sp. che, combinando i due approcci, risulta essere la seconda specie più abbondante all'interno del record faunistico del Riparo del Broion dopo il castoro, che però risulta essere presente soltanto nell'US11. Seguono poi in ordine di abbondanza il cinghiale (*Sus scrofa*) e il cervo rosso (*Cervus elaphus*). Aumenta considerevolmente anche il numero totale dei cervidi e dei carnivori e in generale, il conteggio totale del NISP che passa da 638 frammenti determinati tassonomicamente tramite analisi morfologiche tradizionali a 750 (tabella 12).

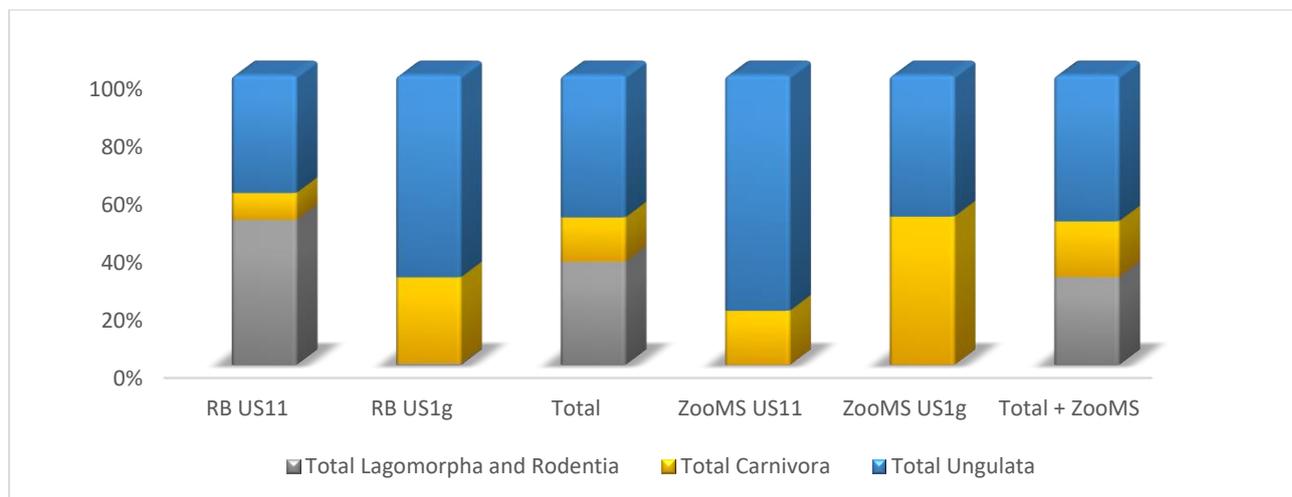


Figura 15. Confronto dati archeozoologici ottenuti dalle analisi morfologiche e dalla ZooMS dei livelli 1g e 1f e US 11+ rispettive sottunità del Riparo del Broion (RB).

Taxa	RB US11			RB US1g+1f			ZooMS US11			ZooMS US1g+1f		Totale	%
	NISP	%	NMI	NISP	%	NMI	NISP	%	NISP	%			
<i>Lepus europaeus</i>	1	0.2	1	1	0.5	1					2	0.2	
<i>Marmota marmota</i>	1	0.2	1								1	0.1	
<i>Castor fiber</i>	225	49.6	6								225	30	
Totale Lagomorpha e Rodentia	227	50.1	8	1	0.5	1					228	30.4	
<i>Canis lupus</i>	7	1.5	3	2	1	2	1	3.1			10	1.3	
<i>Vulpes sp.</i>	5	1.1	1								5	0.6	
<i>Vulpes vulpes</i>				3	1.6	1					3	0.4	
<i>Alopex lagopus</i>	1	0.2	1								1	0.1	
<i>Ursus arctos</i>	3	0.6	2	3	1.6	1					6	0.8	
<i>Ursus spelaeus</i>	1	0.2	1	9	4.8	2					10	1.3	
<i>Ursus sp.</i>	7	1.5	1	25	13.5	2	3	9.3	13	16.2	48	6.4	
<i>Mustela erminea</i>				1	0.5	1					1	0.1	
<i>Crocota crocuta</i>	2	0.4	1						1	1.2	3	0.4	
<i>Felis silvestris</i>	1	0.2	1								1	0.1	
<i>Felis sp.</i>				1	0.5	1					1	0.1	
Carnivora indet.	15	3.3		11	5.9	4	2	6.2	27	33.7	55	7.3	
Totale Carnivora	42	9.2	11	55	29.7		6	18.7	41	51.2	144	19.2	
<i>Sus scrofa</i>	9	1.9	3	11	5.9	4			7	8.7	27	3.6	
<i>Megaloceros giganteus</i>	11	2.4	1	2	1	1					13	1.7	
<i>Alces alces</i>	2	0.4	1	2	1	1					4	0.5	
<i>Cervus elaphus</i>	17	3.7	2	7	3.7	2					24	3.2	
<i>Capreolus capreolus</i>	5	1.1	2	7	3.7	2					12	1.6	
Cervidae indet.	36	7.9		10	5.4		5	15.6	16	20	67	8.9	
<i>Bos/Bison</i>	2	0.4	1	2	1	1	1		1	1.2	6	0.8	

<i>Capra ibex</i>				2	1	2			2	0.2		
<i>Rupicapra rupicapra</i>	3	0.6	1						3	0.4		
Caprinae indet.	4	0.8	1						4	0.5		
<i>Equus ferus</i>	2	0.4	2						2	0.2		
<i>Equus</i> sp.	1	0.2	1						1	0.1		
Ungulata indet.	92	20.3		86	46.4	20	62.5	15	18.7	213	28.4	
Total Ungulata	184	40.6		129	69.7	15	26	81.2	39	48.7	378	50.4
Total NISP	453	100		185	100	32	100	80	100	750	100	

Tabella 12. Tabella generale dei campioni analizzati del Riparo del Broion (RB). È riportato: NISP US11+ rispettive sottounità e NISP livelli 1g+1f ottenuto con analisi morfologiche, NISP US 11+rispettive sottounità e livelli 1g+1f ottenuto con analisi ZooMS e NISP totale ottenuto combinando le due metodologie.

Sulla base delle specie più abbondanti registrate al Broion è possibile fornire delle informazioni riguardanti l'ambiente che caratterizzava questo sito tra 50,000 e 42,000 anni fa circa: la presenza preponderante del castoro nell'US11 e la necessità di avere accesso costante all'acqua per questo roditore, suggerisce un ambiente in cui doveva esserci disponibilità di sistemi di acqua dolce come fiumi, ruscelli, laghi non molto profondi e zone umide a ridosso di aree boschive. L'orso (*Ursus* sp.), il cervo rosso (*Cervus elaphus*) e il cinghiale (*Sus scrofa*) prediligono boschi di montagna intervallati da zone aperte come prati alpini, preferiti dai cervi, e zone con vegetazione più fitta e densa prediletti da orsi e cinghiali per potersi nascondere e rifugiare. In base alle tracce registrate sui reperti osteologici è possibile ipotizzare che gruppi di cacciatori neandertaliani cacciassero e sfruttassero la carcassa del castoro per vari scopi, non solo per la carne e quindi come cibo, ma anche per la pelliccia (Romandini et al., 2018a). Anche nella grotta di San Bernardino sono stati identificati 29 frammenti ossei di *Castor fiber*, di cui 3 con cutmarks; in base alle caratteristiche delle strie individuate potrebbero essere finalizzate alla pratica dello spellamento e della rimozione dei tendini (Terlato et al., 2021). Le attività venatorie non si concentravano però solo su questo roditore, in quanto sono state registrate molte tracce di scarnificazione su frammenti diafisari di cervidi di varia taglia (dal cervo rosso al megacero) e anche su un frammento di tibia di *Equus ferus*. Durante la fine del Paleolitico medio al Riparo del Broion e più in generale sui Colli Berici i gruppi neandertaliani sembrano dedicarsi prevalentemente alla caccia nei confronti del castoro e di ungulati di media/medio-grande taglia.

Per quanto riguarda la fase uluzziana successiva (livelli 1g/e/f), le tracce di macellazione sono state registrate su diversi distretti scheletrici di orso, in particolare in corrispondenza della fossa masseterica di un emimandibola e su un grande sesamoide, molto probabilmente con l'obiettivo

di spellare il grande predatore. Lo sfruttamento da parte degli uomini di Neanderthal nei confronti degli orsi delle caverne e degli orsi bruni è stato dimostrato ampiamente a Rio Secco e a Fumane (Romandini et al., 2018b), dove tracce di macellazione su *Ursus arctos* si riscontrano anche nei successivi livelli uluzziani A3 e A4 (Romandini, 2009-2011; Tagliacozzo et al., 2013) rendendo evidente che in un ecosistema in cui convivono queste specie, le interazioni risultano essere inevitabili.

Per entrambe le unità stratigrafiche considerate, ma in maniera più evidente per il livello uluzziano, la combinazione di ZooMS e analisi archeozoologiche tradizionali, ha permesso di ottenere più informazioni riguardanti la composizione dell'assemblaggio faunistico nelle due fasi di frequentazione musteriana e uluzziana considerate nello studio, e di dipingere un quadro più esaustivo anche di ciò che circondava il riparo, ricostruendo, per quanto possibile, l'ambiente a quel tempo.

3. Roccia San Sebastiano (Mondragone)

3.1 Il sito e gli scavi archeologici

Roccia San Sebastiano si trova nel Comune di Mondragone (Caserta, Campania nord-occidentale).

Il paesaggio circostante è caratterizzato dai 27 km del Litorale Domitio, che si estende tra i comuni di Castel Volturno e Cellole. Questa zona è caratterizzata da due aree pianeggianti originate nel Tardo Quaternario: la prima, fa parte della pianura alluvionale del Garigliano, mentre la seconda si trova nella Pianura Campaniana e comprende la foce del fiume Volturno. Queste zone sono racchiuse dall'alto rilievo carbonatico del monte Massico (Billi et al., 1997; Aiello et al. 2018).

Roccia San Sebastiano è una grotta tettonico-carsica che si apre ai piedi del versante meridionale del monte Massico. Il monte è caratterizzato da affioramenti calcarei del Cretaceo attribuibili alle unità paleo-geografiche del monte Matese e del monte Maggiore (figura 16).

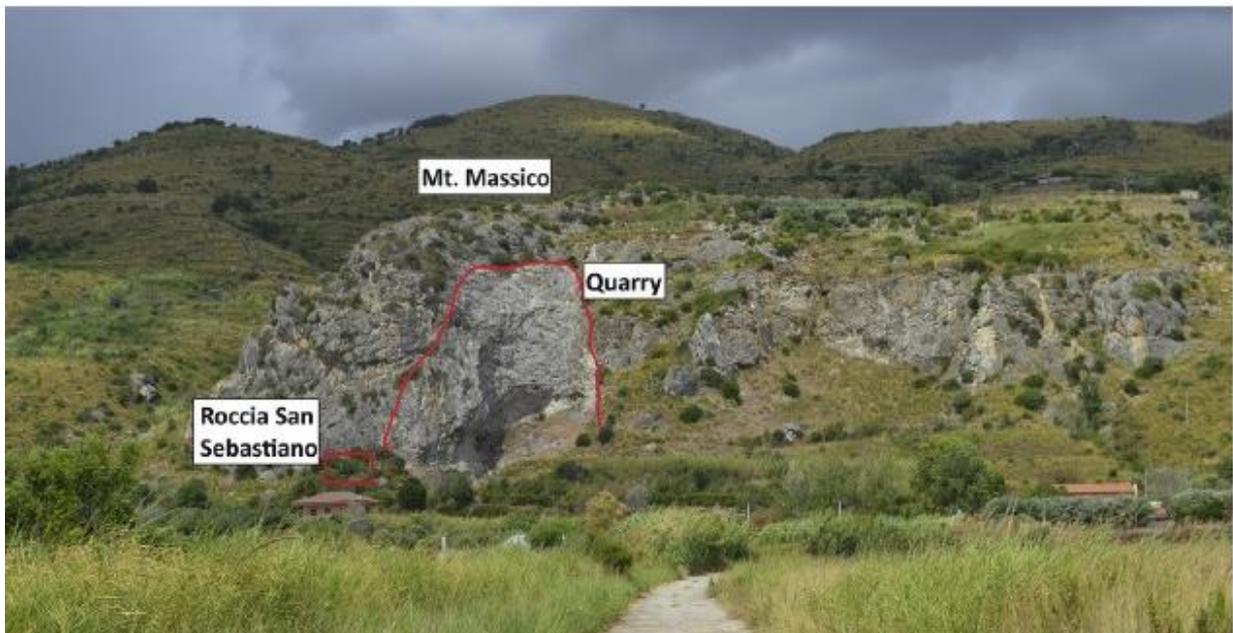


Figura 16. Localizzazione della Grotta di Roccia San Sebastiano (Collina et al., 2020)

L'ingresso della grotta si trova ad un'altitudine di circa 40 m s.l.m., nei pressi di una cava di calcare abbandonata. L'entrata è costituita da uno stretto passaggio che si allarga in una camera che si estende in direzione Nord-Est. Al momento della scoperta, l'ingresso della grotta era ostruito da antichi depositi franosi e dalle rocce residue della vicina cava. Lo studio stratigrafico dei depositi di riempimento della grotta ha evidenziato l'alternanza di diverse fasi di deposizione

in cui la sedimentazione silicoclastica (dominata da crolli e accumuli di detriti) si è alternata a fasi di precipitazione carbonatica (Belluomini et al., 2007).

Il sito è diviso in due parti distinte: il riparo, di circa 12 m di lunghezza e 3 m di profondità, e la grotta, le cui dimensioni non sono ancora state accertate perché è ancora parzialmente ostruita da sedimenti rielaborati. Il riparo è stato riempito con strati spessi di depositi a grana fine e grossolana (sedimenti alloctoni) e grandi detriti (i.e. sedimenti autoctoni derivanti dal crollo del soffitto della grotta).

Lo studio stratigrafico di una sezione situata nella parte centrale del riparo ha permesso l'identificazione di due grandi unità, separate l'una dall'altra da un livello carbonatico: l'unità inferiore con sedimenti sabbiosi rossastri è ricca di resti faunistici e litici; l'unità superiore è costituita da detriti a grana grossolana e sedimenti rielaborati con la presenza di miscugli di reperti paleolitici e storici (Collina et al., 2020).

La grotta di Roccia San Sebastiano è stata scoperta nel dicembre 1999 nel corso di indagini sistematiche nell'ambito di un progetto promosso dalla cattedra di Preistoria dell'Università di Napoli "Federico II", il Museo Civico Biagio Greco di Mondragone insieme alla Soprintendenza Archeologica di Salerno, Avellino, Benevento e Caserta.

Negli anni successivi, la grotta è stata inserita in un progetto di ricerca di carattere geoarcheologico volto a produrre uno studio territoriale dettagliato sulle dinamiche della frequentazione dell'area durante i periodi preistorici e protostorici (Aiello et al. 2018).

Dal 2001 al 2010 lo scavo sistematico si è concentrato sulla rimozione del sedimento all'esterno della grotta e dei sedimenti rielaborati all'interno, che presentavano una miscela di manufatti paleolitici, romani e medievali. Il primo livello è stato scavato dal 2003 su una superficie di 6 m², livello chiamato C e riconosciuto come Gravettiano, esposto nella zona F-E 10, 11, 12 (Collina & Gallotti, 2007; Collina et al., 2008). Inoltre, è stato eseguito un saggio stratigrafico di 2x1 m nei quadrati E14-E15 per comprendere le potenzialità della sequenza stratigrafica della grotta.

La trincea raggiunge i 2,8 m di profondità (fino alla fondazione dello strato sterile) e fornisce la prima descrizione archeo-stratigrafica della grotta.

Dal 2011 al 2019 gli scavi si sono focalizzati sull'ampliamento della trincea E14-E15 in F14 al fine di valutare il rapporto tra il grande blocco crollato e il deposito archeologico (es. definire se il blocco era presente o meno durante le occupazioni preistoriche). La trincea in F14 ha

raggiunto la stessa profondità della trincea E14-E15 (2,8 m). Un ulteriore allargamento successivo della trincea è stato eseguito per 30 cm² nel quadrato E16.

I livelli archeologico/litostratigrafici sono stati identificati ed etichettati con numeri consecutivi (Unità 1, Unità 2, Unità 3). Successivamente lo scavo è stato effettuato mediante tagli artificiali di 5-7 cm seguendo le inclinazioni degli strati, la presenza di elementi archeologici e/o la dispersione di materiali archeologici. Questi tagli sono stati indicati da "t" più un numero consecutivo (t1, t2, tn).

Le tre unità principali (da 1 a 3) presentano caratteristiche simili in termini di colore e composizione dei sedimenti. In base alle differenze granulometriche è possibile identificare otto sottolivelli di spessore variabile (figura 17):

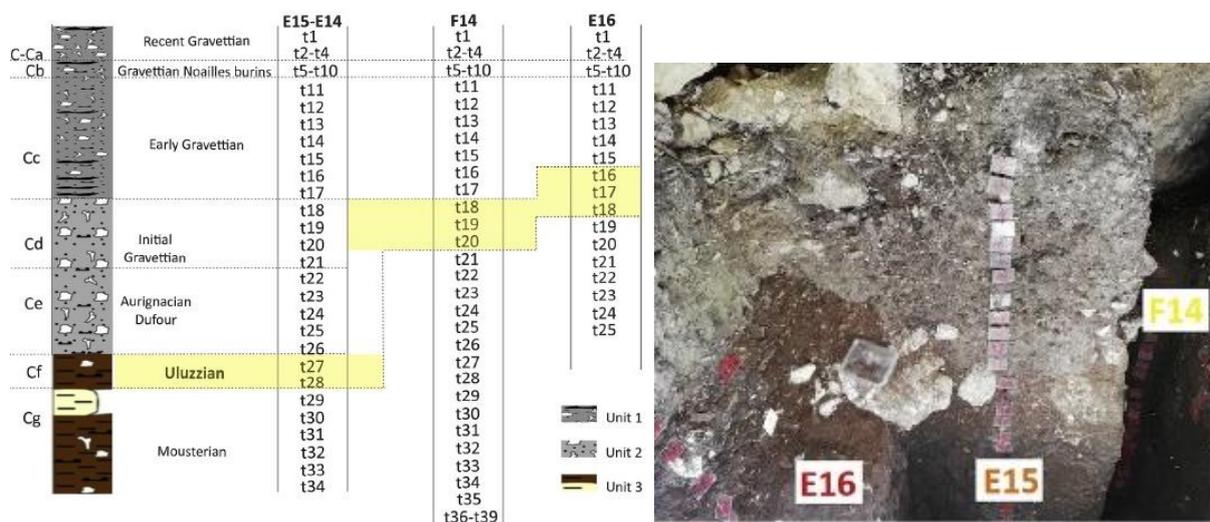


Figura 17. Sequenza stratigrafica di Rocca San Sebastiano con sottolineato il livello uluzziano. Particolare dell'area di scavo (Collina et al., 2020).

Unità 1: l'unità comprende i sottolivelli Ca, Cb, Cc (in ordine stratigrafico inverso). Sono costituiti da depositi limosi sabbiosi brunastri con occasionali concrezioni carbonatiche. La parte più alta dell'unità mostra una matrice più grossolana, mentre alla base si riscontrano tracce di livelli di carbone e ciottoli di carbonato.

Unità 2: l'unità comprende i sottolivelli Cd, Ce. Sono costituiti da un deposito di limo sabbioso bruno-rossastro con la presenza occasionale di ciottoli calcarei. Un limite evidente separa il livello inferiore Ce da 150 cm di depositi limosi sabbiosi scuri, ricchi di sostanza organica e con abbondanti resti di fauna. I sedimenti presentano una debole pendenza verso l'interno della grotta. Un grande blocco di calcare separa il livello sottostante Ce dai livelli superiori.

Unità 3: l'unità comprende i sottolivelli Cf, Cg. Si compone di argilla compatta 3a-rossastra, con ghiaia calcarea scarsa. 3b- sottile livello giallastro.

3.2 Materiali analisi archeozoologiche e proteomiche

L'insieme faunistico preso in esame consta di 2364 frammenti ossei provenienti dai quadrati E16 (tagli 16 e 17) e F14 (tagli 18, 19 e 20) associati a industria litica uluzziana (Collina et al., 2020).

I reperti non si presentano particolarmente compromessi dal punto di vista tafonomico, tuttavia, i frammenti ossei che presentavano fratture e distacchi della superficie imputabili a disidratazione o fratture riconducibili allo scavo, sono stati consolidati con colla reversibile UHU.

Tutti i frammenti ossei che risultavano indeterminati dal punto di vista tassonomico sono stati ricontrollati per poi essere selezionati per le analisi proteomiche. La selezione è avvenuta tenendo in considerazione i criteri già descritti precedentemente. Infine, sono stati selezionati e sottoposti alle analisi proteomiche 55 campioni.

3.3 Risultati analisi archeozoologiche

Insieme faunistico

Di tutti i frammenti ossei analizzati, 514 sono stati identificati a livello tassonomico; quindi, è stato possibile determinare una percentuale molto alta di resti (22.5 %). Nei casi in cui non è stato possibile risalire alla specie, si è registrata solamente la probabile dimensione del mammifero. Appare evidente come gli ungulati prevalgano nettamente sui resti di carnivori nel totale dei resti determinati. La specie in assoluto più rappresentata è il *Cervus elaphus* (NISP=112), abbastanza abbondanti sono anche i frammenti di *Bos/Bison* (NISP=36), si segnalano tra i più abbondanti anche cervidi di taglia inferiore come il *Capreolus capreolus* (NISP=23) e resti di *Equus ferus* (NISP=21). Molto meno abbondanti risultano essere invece i caprini, i carnivori e le specie di piccola taglia come, per esempio, la lepre (NISP=2). Resti di *Canis lupus* e *Lepus* sp. sono stati registrati soltanto nel quadrato F14 taglio 18, che risulta essere quello con più abbondanza e varietà di frammenti osteologici rinvenuti (insieme al taglio 19). In generale, il record faunistico risulta composto per lo più da ungulati di medio-grande

taglia. Le uniche specie presenti in tutti i quadrati presi in considerazione sono i cervi e cervidi di medio-piccola dimensione (tabella 13 e figura 18).

	q.E16 T16		q.E16 T17		q.F14 T18		q.F14 T19		q.F14 T20		NMI
	NISP	%	NISP	%	NISP	%	NISP	%	NISP	%	
<i>Lepus sp.</i>					2	1.2					1
TOTALE Rodentia-Lagomorpha											1
<i>Canis lupus</i>					1	0.6					1
Carnivora indet.					2				1	3.8	
TOTALE Carnivora					5				1	3.8	1
<i>Equus ferus</i>	4	5.5	2	3.8	2	1.2	7	3.3			1
<i>Sus scrofa</i>			1	1.9	5	3.1	7	3.3	1	3.8	3
<i>Megaloceros giganteus</i>	1	1.3									
<i>Cervus elaphus</i>	19	26.3	20	38.4	32	20.3	34	16.4	7	26.9	5
<i>Dama dama</i>	1	1.3					1	0.4			
<i>Capreolus capreolus</i>	2	2.7			8	5.0	13	6.2			
Cervidae	2	2.7	2	3.8	4	2.5	1	0.4	5	19.2	3
<i>Bos primigenius</i>					6	3.8					
<i>Bos/Bison</i>	5	6.9	3	5.7	8	5.0	5	2.4			2
<i>Capra ibex</i>											
<i>Rupicapra rupicapra</i>	2	2.7			1	0.6	1	0.4			1
Caprinae					1	0.6	1	0.4	1	3.8	
Ungulata	36		24	46.1	85	54.1	137	66.1	12	46.1	
TOTALE Ungulata	72	100	52	100	152	96.8	207	100	26	100	15
TOTALE NISP	72	100	52	100	157	100	207	100	26	100	17
mamm. piccola taglia					41	5.4	1	0.1			
mamm. medio-piccola taglia					38	5.0	2	0.2			
mamm. media taglia					116	15.5	63	7.1			
mamm. medio-grande	43	26.3	5	4.4	276	36.9	171	19.4	15	15.1	
mamm. grande taglia	4	2.4	1	0.8	4	0.5	4	0.4			
mamm. taglia indeterminata	44	26.9	54	48.2	114	15.2	429	48.9	58	58.5	
tot. mamm. indeterminati	91	55.8	60	53.5	589	78.9	670	76.3	73	73.7	
TOTALE NR	163	100	112	100	746	100	877	100	99	100	
frammenti combusti	31	86.1	18	94.7	130	76	224	82.3	47	88.6	
frammenti calcinati	5	13.8	1	5.2	41	23.9	48	17.6	6	11.3	
Totale frammenti combusti	36	100	19	100	171	100	272	100	53	100	

Tabella 13. Tabella tassonomica e tafonomica riassuntiva generale dei quadrati uluzziani presi in esame (E16 (tagli 16 e 17) e F14 (tagli 18, 19 e 20) di Roccia San Sebastiano.

Al fine di valutare l'abbondanza delle specie all'interno del contesto, è stato calcolato il NISP e si è stimato il numero minimo degli individui (NMI) (Bökönyi, 1970).

Lagomorfi

Leporidae

Lepus sp.: sono stati individuati due elementi scheletrici attribuibili a questa specie. Una diafisi prossimale postero-mediale di una tibia e un corpo vertebrale. Quest'ultimo si presenta non fuso quindi presumibilmente appartenente a un individuo giovane. Informazioni riguardanti l'età dell'altro frammento non possono essere dedotte, motivo per cui è impossibile dire se si tratti dello stesso individuo. Di conseguenza nel conteggio del numero minimo di individui ne è stato considerato soltanto uno.

Carnivori

Canidae

Canis lupus: è stato riconosciuto un solo resto, un incisivo superiore III sinistro di un individuo adulto di I classe.

Ungulati

Artiodactyla

Suidae

Sus scrofa: sulla base dei 17 frammenti ossei ascrivibili a questa specie, sono stati stimati 3 individui: un giovane/adulto, un giovane e un adulto di I classe. Anche in questo caso la stima dell'età alla morte è avvenuta osservando il grado di usura e di eruzione dentaria. Altri elementi anatomici ascrivibili a questa specie sono per lo più falangi, frammenti del carpo e del metacarpo.

Cervidae

Megaloceros giganteus: è stata riconosciuta soltanto una diafisi di una tibia riferibile ad un unico individuo appartenente a questa specie.

Cervus elaphus: come precedentemente detto, questa è la specie numericamente più abbondante all'interno del sito. Infatti sono stati riconosciuti almeno 5 individui appartenenti a diverse classi di età: un individuo senile (11-12 anni) rappresentato da RSS279 e RSS327, rispettivamente un premolare superiore e un molare I inferiore particolarmente usurati; un individuo adulto di II classe rappresentato da RSS39 e RSS33, un altro adulto di II classe rappresentato da RSS275 perché con grado di usura dentale diverso e di taglia differente rispetto al primo; un adulto di I classe rappresentato da RSS89 e infine un giovane (21-24 mesi) rappresentato da RSS281, RSS272, RSS305, RSS38. La stima dell'età alla morte è stata effettuata tramite l'osservazione del grado di usura dentale.

Capreolus capreolus: sono stati assegnati al capriolo 23 frammenti ossei, principalmente attribuibili ad elementi degli arti. Da questi sono stati stimati 3 individui, 2 adulti e 1 giovane. L'adulto è rappresentato da RSS216 e RSS217 di grande taglia, mentre l'altro, di taglia inferiore è rappresentato da RSS60. L'individuo giovane (<2 anni) è rappresentato da RSS278 e RSS359.

Cervidae: è stata registrata la presenza di molti resti appartenenti genericamente alla categoria di "cervidi" tra la media e la medio-grande taglia. All'interno di questa categoria ci sono resti non identificati ascrivibili alla specie di *Capreolus capreolus* oppure *Dama dama* o *Cervus elaphus*. Per lo più questi resti "non classificabili" sono frammenti di denti, di diafisi di ossa lunghe come tibia, omero e radio ma anche frammenti di palco.

Bovidae

Bos/Bison: dai 36 resti individuati di *Bos/Bison*, sono stati stimati 2 individui: 1 giovane rappresentato da RSS319 e RSS299 e 1 adulto rappresentato da RSS122, RSS86, RSS207, RSS306, RSS263, RSS108, RSS119, RSS274, RSS285, RSS24, RSS23, RSS22, RSS313, RSS346, RSS87. I frammenti determinati si riferiscono per lo più a denti, falangi, metapodiali e diafisi di ossa lunghe.

Caprinae

Rupicapra rupicapra: sono stati assegnati al camoscio soltanto 4 elementi riconducibili a un individuo adulto generico.

Perissodactyla

Equidae

Equus ferus: sono stati individuati 21 resti, per la maggior parte denti, che hanno permesso di stimare un numero minimo di individui pari a 2; in particolare un giovane (7-26 mesi) rappresentato da RSS208, RSS209, RSS31, RSS210 e RSS32 e un adulto/senile rappresentato da RSS166.



Figura 18.1) *Sus scrofa*. Epistroteo. 2) *Cervus elaphus*. LM¹. 3) *Bos/Bison*. Falange prossimale I. 4) *Equus ferus*. LP³⁻⁴. 5) *Cervus elaphus*. Rp₃. 6) *Equus ferus*. LP². 7) *Equus ferus*. Epifisi distale tibia sinistra.

3.4 Risultati analisi tafonomiche

Modificazioni non antropiche

Il 75.4 % dei frammenti ossei presi in esame risulta inferiore ai 3 cm. Tra gli agenti naturali che hanno influenzato e caratterizzano contemporaneamente anche più di una superficie delle ossa, gli apparati radicali hanno agito soltanto sul 2.7 % dei resti, lo 0.88 % presenta concrezioni, lo 0.9 % presenta una certa esfoliazione sulla superficie. Soltanto 4 frammenti appaiono arrotondati come per effetto della fluitazione a debole intensità dell'acqua, mentre ossidi di manganese caratterizzano il 26.8 % dei campioni.

Modificazioni antropiche

I reperti combusti registrati per i quadrati uluzziani presi in esame sono 559 pari al 23.6 % dell'intero campione analizzato. In particolare, 457 risultano soltanto combuste, quindi presentano una colorazione che va dal marrone al nero e 102 invece risultano calcinate.

Nella totalità degli elementi combusti (559), 3 sono stati identificati come *Bos/Bison*, 4 come *Capreolus capreolus*, 1 Cervidae, 16 *Cervus elaphus*, 1 *Dama dama*, 51 ungulati mentre i restanti 378 resti risultano indeterminati. Di questi ultimi, 220 sono frammenti di diafisi, 26 frammenti di epifisi, 2 frammenti di corno, 1 frammento di dente e 1 di craniale.

Tracce antropiche in associazione a combustione si riconoscono su 24 frammenti (20 combusti e 4 calcinati). Cutmarks si trovano per lo più su frammenti di diafisi di ossa indeterminate o ungulati, che per questo motivo, sono difficili da contestualizzare e rendono complicato comprendere a quale fase del depezzamento facciano riferimento. Degne di nota sono alcune strie in corrispondenza della diafisi posteriore medio-distale della tibia di un *Cervus elaphus*. Un frammento ha delle caratteristiche tali da potersi dire lavorato (figura 19-2), 3 frammenti ossei indeterminati presentano incavi o punti di impatto in associazione alla combustione, 9 campioni sono stati riconosciuti come coni di percussione che attestano la pratica della fratturazione delle ossa con l'obiettivo di recuperarne il midollo.

119 frammenti ossei non combusti presentano tracce lasciate dall'uomo durante varie fasi del processo di macellazione e sfruttamento delle carcasse come, per esempio, lo spellamento (metacarpo *Cervus elaphus* RSS213) o il distacco delle masse di carne (coxale *Cervus elaphus* RSS142). La maggior parte delle tracce antropiche si concentra su resti indeterminati (48.7%)

(figura 19) e resti di ungulati (17.6%) ma anche sul cervo rosso (15.9%), sul bisonte (0.8%), sul capriolo (2.5%), sul cavallo (0.8%), sul camoscio (1.6%) e sul cinghiale (1.6%).



Figura 19. Alcuni frammenti ossei con strie dal contesto di Rocca San Sebastiano: 1) RSS15. Diafisi di ungulato di media/grande taglia con raschiature con relativo ingrandimento. 2) Diafisi indeterminata con strie e probabile lavorazione con relativo ingrandimento. 3) RSS253. Spina di vertebra di ungulato con strie probabilmente da ricondurre a scarnificazione, con relativo ingrandimento.

Per quanto riguarda il cervo rosso, alcune ossa lunghe mostrano una più elevata percentuale di macellazione: tibia (26.3%), omero (21%), femore (10.5%), metacarpo (10.5%), metapodiale (10.5%), coxale (5.2%), mandibola (5.2%) e radio (5.2%). Tutte le altre ossa non menzionate, non riportano tracce legate all'attività di sfruttamento dell'animale da parte dell'uomo. La maggior parte dei frammenti ossei che presentano dei punti di impatto (21) sono da riferire a ungulati/mammiferi indeterminati di media/grande taglia e sono localizzate soprattutto su porzioni diafisarie di ossa particolarmente lunghe, spesse e resistenti come tibie, femori e omeri. Uno di questi è stato individuato sull'epifisi distale di tibia di *Equus ferus* dove è presente anche un doppio cono di percussione. Sono stati poi riconosciuti altri 52 coni di percussione e 2 porzioni diafisarie mostrano evidenze tafonomiche che testimoniano l'utilizzo come ritoccatore (tabella 14).

RSS taxa	totale NISP	NR con strie	NR con PDI	NR con PDI e strie	cono di percussione	cono di percussione ritoccatore/la vorato	totale antropico	% antropico	calpestio	NR con tracce carnivori	NR con tracce di roditori	NR combusti	NR combusti con strie
<i>Lepus sp.</i>	2												
<i>Megaloceros giganteus</i>	1												
<i>Cervus elaphus</i>	112	19	7	1	1		28	25		1		16	1
<i>Dama dama</i>	2											1	
<i>Capreolus capreolus</i>	23	3	1				4	17.3			1	4	
<i>Cervidae</i>	14	3					3	21.4				1	
<i>Bos primigenius</i>	6												
<i>Bos/Bison</i>	21	1	1				2	9.5	1			3	
<i>Rupicapra sp.</i>	4	2					2	50					
<i>Caprinae</i>	3	1					1	33.3					
<i>Sus scrofa</i>	14	1					1	7.1				1	
<i>Equus ferus</i>	15	1	1		1		3	20					
<i>Canis lupus</i>	1												
Ungulato	294	24	4	4	12	2	46	15.6		2	1	23	5
Carnivoro	3												
tot. determinati	531	55	14	5	14	2	90	16.9	1	1	2	49	6
%	100	10.3	2.6	0.9	2.6	0.3	16.9						
frammenti indeterminati	699	34		1	29	1	2	67	9.5	1		252	12
piccola taglia	42												
media-piccola	40			1			1	2.5				32	
media taglia	179	3			4		7	3.9				60	3
media-grande taglia	510	16	1		5		22	4.3	1		1	147	3

grande taglia	13	2	1		2			5	38.4			1	4	1
totale	1483	55	2	2	40	1	2	102	6.8	2		2	495	19
indeterminati														

Tabella 14. Tabella riassuntiva delle tracce antropiche di macellazione e/o sfruttamento della carcassa dei vari taxa anche in associazione a combustione dei quadrati E16 (tagli 16 e 17) e F14 (tagli 18, 19 e 20) di Roccia San Sebastiano.

3.5 Risultati analisi proteomiche (ZooMS)

Sono stati selezionati e analizzati 55 campioni del tutto indeterminati o campioni per cui l'identificazione morfologica non rendeva possibile la distinzione tra due specie simili in termini di taglia dell'animale (es. *Equus/Bos*).

Di tutti i campioni analizzati, 41 hanno restituito informazioni di carattere tassonomico. I risultati ottenuti hanno permesso di implementare il dato morfologico dal punto di vista quantitativo, non qualitativo in quanto non è stata individuata nessuna nuova specie. I risultati sono assolutamente coerenti e in linea con l'analisi archeozoologica tradizionale (tabella 15).

	qE16 T16		qE16 T17		qF14 T18		qF14 T19		qF14 T20		ZooMS			Total	
	NISP	%	NISP	%	NISP	%	NISP	%	NISP	%	NMI	NISP	%	NISP	%
<i>Lepus sp.</i>					2	1.2					1			2	0.3
TOTALE Rodentia-Lagomorpha											1				
<i>Canis lupus</i>					1	0.6					1			1	0.1
Carnivora indet.					2				1	3.8				3	0.5
TOTALE Carnivora					5				1	3.8	1			6	1.0
<i>Equus ferus</i>	4	5.5	2	3.8	2	1.2	7	3.3			1	6	15.3	21	3.7
<i>Sus scrofa</i>			1	1.9	5	3.1	7	3.3	1	3.8	3	3	7.6	17	3.0
<i>Megaloceros giganteus</i>	1	1.3												1	0.1
<i>Cervus elaphus</i>	19	26.3	20	38.4	32	20.3	34	16.4	7	26.9	5			112	20.2
<i>Dama dama</i>	1	1.3					1	0.4						2	0.3
<i>Capreolus capreolus</i>	2	2.7			8	5.0	13	6.2						23	4.1
Cervidae	2	2.7	2	3.8	4	2.5	1	0.4	5	19.2	3	9	23	23	4.1
<i>Bos primigenius</i>					6	3.8								6	1.0
<i>Bos/Bison</i>	5	6.9	3	5.7	8	5.0	5	2.4			2	9	23	30	5.4
<i>Capra ibex</i>															
<i>Rupicapra sp.</i>	2	2.7			1	0.6	1	0.4			1			4	0.7
Caprinae					1	0.6	1	0.4	1	3.8				3	0.5
Ungulata	36		24	46.1	85	54.1	137	66.1	12	46.1		12	30.7	306	55.2
TOTALE Ungulata	72	100	52	100	152	96.8	207	100	26	100	15	39	100	548	98.9
TOTALE NISP	72	100	52	100	157	100	207	100	26	100	17	39	100	554	100
mamm. piccola taglia					41	5.4	1	0.1						42	2.1
Mamm. medio-piccola taglia					38	5.0	2	0.2						40	2
mamm. media taglia					116	15.5	63	7.1						179	8.9
mamm. medio-grande taglia	43	26.3	5	4.4	276	36.9	171	19.4	15	15.1				510	25.5
mamm. grande taglia	4	2.4	1	0.8	4	0.5	4	0.4						13	0.6
mamm. taglia indeterminata	44	26.9	54	48.2	114	15.2	429	48.9	58	58.5				699	35

tot. mamm. indeterminati	91	55.8	60	53.5	589	78.9	670	76.3	73	73.7	1483	74.2
TOTALE NR	163	100	112	100	746	100	877	100	99	100	1997	100
NR combusti	31	86.1	18	94.7	130	76	224	82.3	47	88.6	450	81.6
NR calcinati	5	13.8	1	5.2	41	23.9	48	17.6	6	11.3	101	18.3
Tot. combusti+calcinati	36	100	19	100	171	100	272	100	53	100	551	100

Tabella 15. Tabella generale con NISP ottenuto con analisi morfologiche, NISP ottenuto con analisi ZooMS e NISP totale ottenuto combinando le due metodologie dei quadrati presi in esame (E16 (tagli 16 e 17) e F14 (tagli 18, 19 e 20)).

Come è possibile notare dalla tabella 15, le specie più piccole in termini di dimensioni non sono documentate (es. *Lepus*, *Vulpes*, *Felis*). Questa mancanza non è stata interpretata come un'assenza di queste specie nel contesto preso in esame, ma piuttosto dovuta alle tecniche di scavo che molto probabilmente non hanno previsto la fase di vaglio e setaccio del sedimento.

Nel caso del campione RSS265, questa tecnica ha confermato che la specie risultava tra le opzioni che erano state considerate sulla base dello studio morfologico del reperto. Si tratta di una diafisi prossimale posteriore di un'ulna di grandi dimensioni, per questo si erano prese in considerazione due opzioni: *Equus ferus* o *Bos/Bison*. La ZooMS ha permesso di determinare in maniera puntuale il reperto come *Equus ferus* (figura 20).

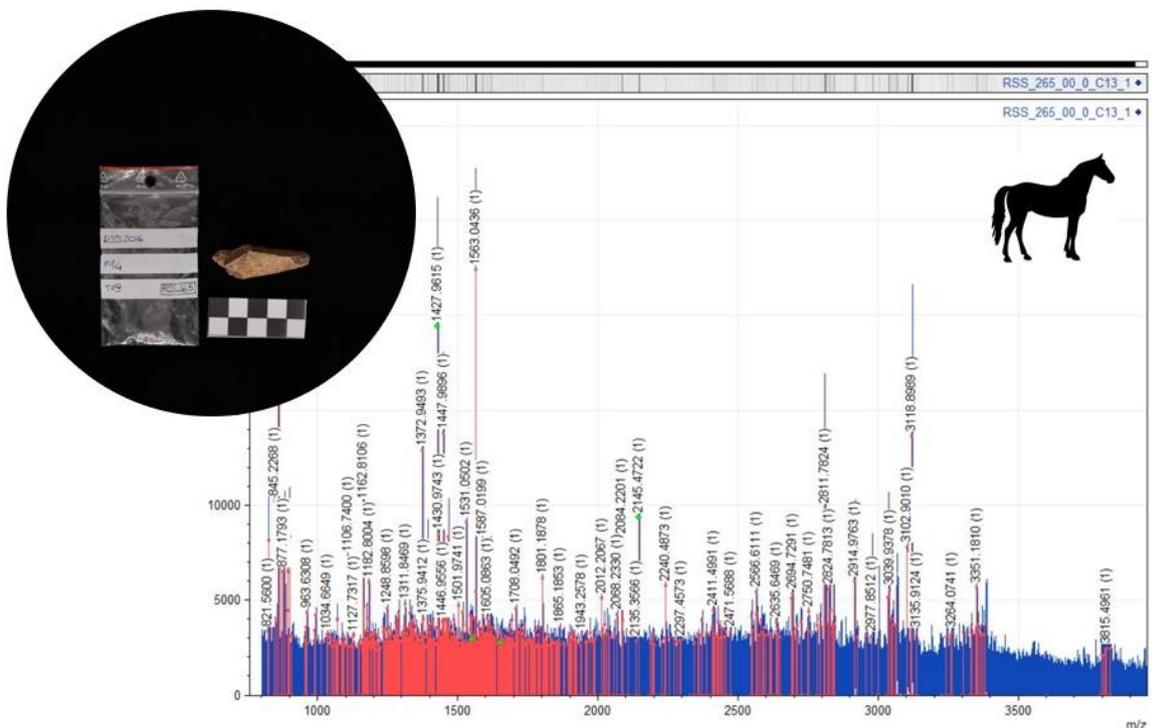


Figura 20: Spettro e foto del campione RSS265 che ha permesso di determinarlo tassonomicamente come *Equus ferus*.

Per 14 campioni non è stato possibile determinare la specie perché non erano presenti i peptidi caratteristici e diagnostici dei diversi taxa (tabella 16). Considerando tutti i campioni analizzati,

il peptide 1105.6 è presente nel cromatogramma di tutti i campioni che hanno fornito informazioni tassonomiche e in tutti risulta essere particolarmente deamidato, dato che ci fornisce la conferma dell'endogenità, autenticità e antichità dei risultati.

Sono stati sottoposti ad analisi proteomica anche due frammenti ossei che presentavano tracce di macellazione: RSS176 (frammento di coxale) e RSS94 (epifisi distale di calcagno). A una prima indagine morfologica, erano state proposte delle determinazioni tassonomiche in base alle caratteristiche del reperto: per il primo frammento si era pensato o a un *Sus scrofa* o a un *Panthera leo spelaea*. Mentre nel caso di RSS94 a un carnivoro di medie dimensioni come un *Canis lupus* o un *Panthera pardus*. L'analisi proteomica è stata risolutiva nel caso del campione RSS176 perché ha permesso di determinare il frammento come *Sus scrofa*, già attestata morfologicamente all'interno del contesto e tracce di macellazione erano state identificate anche su una falange I, appartenente a questa specie. Nel caso invece di RSS94, dall'analisi degli spettri sono emersi i peptidi caratteristici degli ungulati, in particolare dei caprini e dei cervidi. In questo caso, l'analisi morfologica non è stata confermata come nel caso precedente, ma è in linea con i dati ottenuti dal contesto in quanto sono stati identificati altri campioni tra caprini e cervidi che presentano strie.

ID. Lab	P1	A	A'	B	C	P2	D	E	F	F'	G	G'	identificazione ZooMS
RSS472	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS450	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS453	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS446	1105.6												no determinazione
RSS438	1105.6			1427.7		1648.8							bovidae/ovicaprinae/cervidae
RSS429	1105.6			1453.7	1550.8			2131.1					<i>Sus scrofa</i>
RSS424	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS425	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS426	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS427	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8							Cervidae
RSS428	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS420													no determinazione
RSS421													no determinazione
RSS422	1105.6			1427.7		1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS423													no determinazione
RSS418	1105.6			1427.7		1648.8							Bovidae/Ovis-Caprinae/Cervidae
RSS413	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8		2131.1		2899.4			Cervidae
RSS414	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8		2131.1	2883.4				Cervidae
RSS415	1105.6			1427.7		1648.8		2131.1					Bovidae/Ovis-Caprinae/Cervidae
RSS416	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8		2131.1					Cervidae
RSS417	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS419													no determinazione
RSS407	1105.6			1427.7		1648.8		2131.1					Bovidae/Ovis-Caprinae/Cervidae
RSS408													no determinazione

RSS409											no determinazione
RSS410	1105.6		1427.7	1550.8		2145.1					<i>Equus</i> sp.
RSS411	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1	2883.4	2899.4			Cervidae
RSS323	1105.6		1453.7	1550.8		2131.1	2883.4				<i>Sus scrofa</i>
RSS130	1105.6		1453.7								Carnivora/ <i>Sus scrofa</i>
RSS249	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8						Cervidae
RSS250	1105.6										no determinazione
RSS403	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1	2883.4				Cervidae
RSS404											no determinazione
RSS176	1105.6		1453.7	1550.8	1647.8	2131.1					<i>Sus scrofa</i>
RSS396	1105.6		1427.7								Ungulata
RSS398											no determinazione
RSS399											no determinazione
RSS400	1105.6		1427.7		1648.8	2131.1					Bovidae/Caprinae/Cervidae
RSS406											no determinazione
RSS382											no determinazione
RSS371	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8		2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS435	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1	2883.4				Cervidae
RSS461	1105.6		1427.7			2145.1	2883.4				<i>Equus</i> sp.
RSS265	1105.6		1427.7	1550.8	1649.8	2145.1	2883.4				<i>Equus</i> sp.
RSS466											no determinazione
RSS143	1105.6		1427.7	1550.8	1649.8	2145.1					<i>Equus</i> sp.
RSS94	1105.6		1427.7		1648.8		2883.4				<i>Ovis-Caprinae/Cervidae</i>
RSS470	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1	2883.4				Cervidae
RSS379	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2899.4			Cervidae
RSS432	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1	2883.4				Cervidae
RSS433											no determinazione
RSS465	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8	2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS437	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1					Cervidae
RSS443	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8	2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
RSS475	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8	2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>

Tabella 16. Marcatori peptidici individuati con le analisi ZooMS e determinazioni tassonomiche dei campioni dei quadrati uluziani di Roccia San Sebastiano.

3.6 Discussione

Al fine di ricostruire la composizione della fauna a Roccia San Sebastiano, fondamentale è stato l'apporto delle analisi archeozoologiche che hanno permesso di determinare tassonomicamente il 35.9 % dei resti ossei. È stato possibile ottenere questo risultato anche grazie allo stato di conservazione delle ossa all'interno di questo contesto che si presentavano particolarmente grandi (il 68.3 % dei reperti ha dimensioni superiori ai 3 cm), tafonomicamente ben conservate, integre e poco frammentate rispetto ad altri contesti coevi.

La grande abbondanza di cervidi di media e medio/grande taglia, indica un clima temperato e ambienti boschivi inframezzati da radure. I bovini suggeriscono inoltre la presenza di corsi d'acqua a debole intensità ma anche un ambiente a clima più temperato freddo. Infine, la presenza dell'*Equus* indica la disponibilità nei pressi del sito, di ampie praterie aperte.

L'utilizzo e la combinazione delle due tecniche, quella morfologica e quella proteomica, ha permesso di ampliare i dati sulla composizione della fauna del livello uluzziano di Rocca San Sebastiano. I campioni, nonostante provenissero da un sito del Sud Italia, sono risultati idonei per le analisi con la ZooMS fornendo informazioni tassonomiche puntuali e permettendo di effettuare delle determinazioni tassonomiche specifiche dei campioni.

Utilizzo della ZooMS come pre-screening

Nei prossimi due casi studio, la ZooMS è stata applicata con uno scopo ben preciso, quello di individuare la presenza di resti umani che altrimenti non sarebbe stato possibile identificare passando in rassegna tutto il materiale archeozoologico dal punto di vista morfologico a causa della frammentarietà dei resti. Sono stati analizzati soltanto dal punto di vista proteomico due siti in cui erano già stati rinvenuti resti umani. Lo scopo primario è stato dunque cercare di identificare nuovi resti antropici da questi due contesti. Per Grotta del Cavallo (Nardò, Lecce, Puglia), i campioni analizzati provengono dallo stesso livello uluzziano in cui erano stati rinvenuti i denti decidui Cavallo B e C attribuiti ai primi esseri umani moderni ad oggi riconosciuti in Sud Italia (Benazzi et al., 2011). Per Teixonerres (Moià, Barcellona, Spagna), i campioni analizzati provengono dall'unità III che è stata datata tra 51,000 e 44,210 anni cal BP, periodo in cui sono documentate attività di gruppi neandertaliani in questo sito (Rosell Ardèvol et al., 2010).

1. Grotta del Cavallo

1.1 Il sito

Grotta del Cavallo è situata sulla costa rocciosa della baia di Uluzzo, a pochi metri dal Mar Ionio, nei pressi di Santa Caterina (Nardò, Lecce) e si trova a 15 m s.l.m. Il suo ingresso, che misura più di 5 m di larghezza e circa 2,5 m di altezza, affaccia verso Nord-Ovest. La cavità è formata da una singola camera approssimativamente circolare, con un diametro di circa 9 m mentre la volta è alta 3 m circa. Le prime ricerche nella grotta risalgono agli anni '60 grazie alle indagini archeologiche portate avanti da Arturo Palma di Cesnola, dell'Università di Siena. In questa grotta, Palma di Cesnola identificò una sequenza stratigrafica spessa 7 m di importanza fondamentale, che abbraccia un lungo intervallo cronologico: il Paleolitico medio locale (strati N-G), che si chiude con il tardo Musteriano (strato F), il successivo Paleolitico medio-superiore di transizione (strati E, D), sigillato in alto da un orizzonte legato a deposizioni sedimentarie di origine vulcanica (strato C), il Paleolitico superiore finale (strato B, Romanelliano) e le occupazioni dell'Olocene (strato A) (Palma di Cesnola, 1967). Palma di Cesnola descrisse la sequenza uluzziana come uno strato inferiore di sabbie limose ampiamente annerito a causa della sua ricchezza in sottoprodotti di combustione. Lo strato E, di circa 50 cm di spessore venne suddiviso in: livello E-III alla base e livello E-II/I al tetto, uno strato bruno-rossastro, simile allo strato D, spesso circa 30 cm, suddiviso in livello D-II alla base e livello D-I al tetto;

un livello intermedio E/D. Due strati di tephra (Fa sotto e C sopra) segnano il confine stratigrafico e cronologico dell'Uluzziano. Il livello uluzziano di Grotta del Cavallo (EIII) è stato datato a 45/43,000- 40,000 anni fa (Benazzi et al., 2011).

Grotta del Cavallo non è solo il sito in cui è stato riconosciuto l'Uluzziano e descritto per la prima volta, ma attualmente rimane il sito principale in cui questo complesso tecnologico può essere seguito nella sua evoluzione crono-culturale.

Le analisi ZooMS sono state effettuate su frammenti ossei provenienti dagli strati C, D e E (C, D, DI, DII, E, EI, EII, EIII).

1.2 Insieme faunistico

I resti faunistici editi analizzati di Grotta del Cavallo sono associati al livello E (Uluzziano) e F (Musteriano). Avendo analizzato dal punto di vista proteomico, campioni provenienti dal livello Uluzziano, verranno prese in considerazione solo le informazioni riguardanti l'assemblaggio faunistico dello strato E. La fauna è caratterizzata dalla presenza di poche specie, manca ad esempio tutta la categoria dei mustelidi che invece era presente nel sito di Uluzzo C, che si trova all'interno della stessa baia. Mancano anche piccoli e medi carnivori come il gatto selvatico e la lince. Assenti anche alcuni ungulati di media taglia come il daino e il capriolo. Presenti, ma molto scarsi sono i resti di lepre, iena, lupo e cinghiale. L'uro è l'ungulato più comune, seguito da cervi rossi e cavallo. In questo contesto, i carnivori sono abbastanza sporadici, ma è possibile trovare *Vulpes vulpes*, *Canis lupus* e *Crocuta crocuta*. Non vi sono prove evidenti di segni di roscchiatura da parte di carnivori, per questo si presume che la deposizione del materiale osseo sia interamente da imputare all'uomo. Lo strato uluzziano EIII5 è l'unico, ad oggi, interamente studiato (Boscato & Crezzini, 2012): 196 esemplari identificati risultano essere ungulati mentre sette sono carnivori (tabella 17). La composizione della fauna indica che in questa parte della Puglia l'ambiente era caratterizzato da praterie alternate a boschi umidi e aperti con presenza di corsi d'acqua a debole intensità associati ad un clima tendenzialmente temperato e omogeneo.

Taxa	Uluzziano	
	EIII5	
	Nisp	NMI
<i>Lepus</i> sp.	1	1
Totale Lagomorpha	1	1
<i>Crocuta crocuta</i>	1	1

<i>Canis lupus</i>	2	1
<i>Vulpes vulpes</i>	4	1
Totale Carnivora	7	3
<i>Equus ferus</i>	53	3
<i>Equus hydruntinus</i>	1	1
<i>Equus</i> sp.	1	1
<i>Sus scrofa</i>	3	1
<i>Cervus elaphus</i>	52	2
<i>Bos primigenius</i>	86	3
Totale Ungulata	196	11
Totale Nisp	204	

Tabella 17. Tabella riassuntiva del NISP riferito al livello Uluzziano EIII5 della Grotta del Cavallo (Boscato & Crezzini, 2012).

1.3 Materiali analisi proteomiche (ZooMS)

Sono stati inviati presso il Bones Lab del Dipartimento di Beni Culturali di Ravenna per effettuare le analisi proteomiche 174 frammenti ossei. Di questi, 6 sono stati esclusi dalle analisi successive perché, tramite osservazione morfologica, potevano essere determinati tassonomicamente. È stato possibile riconoscere senza servirsi dell'analisi del collagene un dente di *Sus scrofa*, un dente di *Equus ferus* e tre diafisi di ungulati che avevano le caratteristiche tali per essere classificati anche come coni di percussione.

Infine, il collagene è stato estratto da 168 campioni. I frammenti ossei si presentavano particolarmente concrezionati, motivo per cui si è proceduto con il protocollo di estrazione che prevede una prima fase di demineralizzazione con HCl 0.6 M (Buckley et al., 2009).

1.4 Risultati ZooMS

Dei 168 campioni analizzati, 92 non hanno dato informazioni di carattere tassonomico. 13 campioni sono stati identificati come generici ungulati, perché presentavano soltanto il picco a 1427.7, tipico di questa categoria. Per 34 campioni non è stato possibile distinguere tra cervide/bovide/equide e caprino, di conseguenza nella tabella 18 sono state riportate tutte le specie con cui potesse essere identificato quel frammento osseo. 16 campioni sono stati identificati come *Bos/Bison* (figura 21), 7 come *Equus* sp. (figura 21) e 1 solo come cervide, categoria all'interno della quale rientrerebbero il cervo rosso, il daino e il capriolo. Infine, per 3 campioni è stata data come determinazione “Carnivora/*Sus scrofa*” perché è stato osservato soltanto il picco a 1453.7, comune a diversi carnivori e al cinghiale. In generale, la qualità degli

spettri risulta abbastanza scarsa, motivo per cui anche le determinazioni spesso non sono molte specifiche.

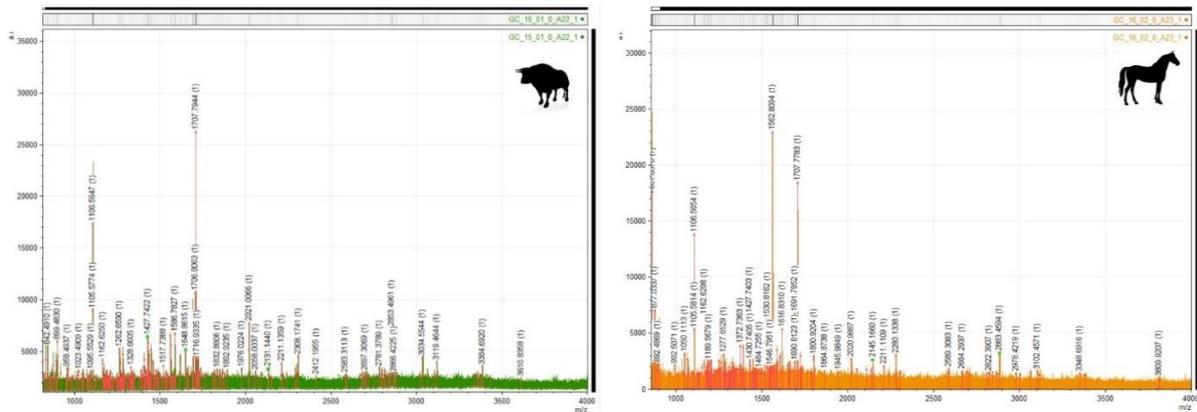


Figura 21. Spettro del campione GC15 identificato come *Bos/Bison* e spettro del campione GC16 identificato come *Equus* sp.

I risultati ottenuti con la ZooMS si dimostrano coerenti e pertinenti ai dati archeozoologici: con entrambi gli approcci la componente carnivora all'interno del record faunistico risulta molto scarsa, mentre gli ungulati sono nettamente più numerosi. Tra questi, l'uro e il cavallo sono in assoluto le specie più numerose (Boscato & Crezzini, 2012).

La conservazione del collagene in questo sito appare particolarmente compromessa da fenomeni diagenetici legati forse alla vicinanza con l'acqua salata del mare e alla posizione geografica, la stessa penuria di risultati è stata riscontrata infatti anche nel sito di Uluzzo C che si trova all'interno della stessa baia, di fronte a Grotta del Cavallo. In questo caso quindi, a causa anche del pessimo stato di conservazione del collagene contenuto nei campioni analizzati, non è stato individuato nessun campione appartenente al genere *Homo*. Sono però in corso le analisi genetiche su dei campioni che hanno fornito dei risultati difficili da interpretare dal punto di vista tassonomico.

ID. lab	P1	A	A'	B	C	P2	D	E	F	F'	G	G'	identificazione ZooMS
GC1													no determinazione
GC2	1105.6												no determinazione
GC3	1105.6			1427.7					2883.4				Ungulata
GC4	1105.6												no determinazione
GC5	1105.6			1427.7					2883.4				Ungulata
GC6	1105.6												no determinazione
GC7	1105.6			1427.7					2883.4				Ungulata
GC8	1105.6												no determinazione
GC9	1105.6			1453.7									Carnivora/ <i>Sus scrofa</i>
GC10	1105.6												no determinazione
GC11	1105.6			1427.7	1550.8				2883.4				Cervidae/ <i>Equus</i> sp.
GC12													no determinazione

GC13	1105.6										no determinazione
GC14	1105.6		1427.7	1550.8		2145.1		2883.4			<i>Equus</i> sp.
GC15	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8	2131.1		2853.4			<i>Bos/Bison</i>
CG16	1105.6		1427.7			2145.1		2883.4			<i>Equus</i> sp.
GC17	1105.6										no determinazione
GC18	1105.6		1427.7		1648.8			2853.4			<i>Bos/Bison</i>
GC19											no determinazione
GC20											no determinazione
GC21	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8			2883.4			Cervidae
GC22	1105.6		1427.7					2883.4			Ungulata
GC23	1105.6										no determinazione
GC24	1105.6		1427.7					2883.4			Ungulata
GC25											no determinazione
GC26	1105.6										no determinazione
GC27	1105.6										no determinazione
GC28	1105.6										no determinazione
GC29	1105.6										no determinazione
GC30	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4			Cervidae/ <i>Equus</i> sp.
GC31	1105.6										no determinazione
GC32	1105.6										no determinazione
GC33	1105.6		1427.7		1648.8			2853.4			<i>Bos/Bison</i>
GC34	1105.6										no determinazione
GC35	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8			2883.4			Cervidae/ <i>Equus</i> sp.
GC36	1105.6										no determinazione
GC37	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4			Cervidae/ <i>Equus</i> sp.
GC38	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4			Cervidae/ <i>Equus</i> sp.
GC41	1105.6		1427.7					2883.4			Ungulata
GC42	1105.6										no determinazione
GC43	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8	2131.1		2853.4			<i>Bos/Bison</i>
GC44	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8			2883.4			Cervidae
GC45	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4			Cervidae/ <i>Equus</i> sp.
GC46	1105.6		1427.7	1550.8	1649.8	2145.1		2883.4			<i>Equus</i> sp.
GC47	1105.6		1427.7	1550.8	1649.8			2883.4			<i>Equus</i> sp.
GC48	1105.6										no determinazione
GC49	1105.6		1427.7					2883.4			Ungulata
GC50											no determinazione
GC51	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8			2853.4			<i>Bos/Bison</i>
GC52	1105.6		1427.7		1648.8						<i>Ovis</i> - Caprinae/Cervidae/Bovidae
GC53											no determinazione
GC54	1105.6										no determinazione
GC55											no determinazione
GC56	1105.6										no determinazione
GC57											no determinazione
GC58	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4			Cervidae/ <i>Equus</i> sp.
GC59	1105.6										no determinazione
GC60	1105.6		1427.7					2883.4			Ungulata
GC61	1105.6		1427.7		1648.8			2853.4			<i>Bos/Bison</i>
GC62	1105.6		1427.7	1550.8	1649.8	2145.1		2883.4			<i>Equus</i> sp.
GC63											no determinazione
GC64	1105.6		1427.7					2883.4			Ungulata
GC65	1105.6		1427.7					2883.4			Ungulata
GC66	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4			Cervidae/ <i>Equus</i> sp.
GC67	1105.6										no determinazione
GC68	1105.6										no determinazione
GC69	1105.6										no determinazione
GC70											no determinazione
GC71											no determinazione

GC73	1105.6		1427.7		1648.8							<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
GC74	1105.6											no determinazione
GC75	1105.6		1427.7					2883.4				<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
GC76	1105.6		1427.7		1648.8							<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
GC77	1105.6											no determinazione
GC78	1105.6		1427.7		1648.8							<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
GC79	1105.6		1427.7		1648.8			2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC80	1105.6											no determinazione
GC81	1105.6											no determinazione
GC83	1105.6											no determinazione
GC84												no determinazione
GC85	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4				<i>Cervidae/Equus sp.</i>
GC86												no determinazione
GC87	1105.6											no determinazione
GC88												no determinazione
GC89	1105.6											no determinazione
GC90												no determinazione
GC91	1105.6											no determinazione
GC92	1105.6		1427.7	1550.8	1649.8			2883.4				<i>Equus sp.</i>
GC93			1453.7									<i>Carnivora/Sus scrofa</i>
GC94												no determinazione
GC95												no determinazione
GC96	1145.1		1453.7									<i>Carnivora/Sus scrofa</i>
GC97												no determinazione
GC98	1105.6											no determinazione
GC99	1105.6											no determinazione
GC100	1105.6											no determinazione
GC101	1105.6		1427.7					2883.4				<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Equus sp.</i>
GC102	1105.6											no determinazione
GC103	1105.6		1427.7									Ungulata
GC104	1105.6											no determinazione
GC105	1105.6		1427.7	1550.8			2145.1	2883.4				<i>Equus sp.</i>
GC106	1105.6											no determinazione
GC107	1105.6		1427.7	1550.8	1649.8		2145.1	2883.4				<i>Equus sp.</i>
GC108												no determinazione
GC109												no determinazione
GC110	1105.6		1427.7					2883.4				<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Equus sp.</i>
GC111	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4				<i>Cervidae/Equus sp.</i>
GC112	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4				<i>Cervidae/Equus sp.</i>
GC113												no determinazione
GC115	1105.6											no determinazione
GC116	1105.6											no determinazione
GC117												no determinazione
GC118	1105.6		1427.7		1648.8			2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC119												no determinazione
GC121												no determinazione
GC122	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC123	1105.6		1427.7					2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC124	1105.6		1427.7		1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC125												no determinazione
GC127												no determinazione
GC128												no determinazione

GC129												no determinazione
GC130												no determinazione
GC131												no determinazione
GC132	1105.6		1427.7		1648.8			2883.4				<i>Ovis-Caprinae/Cervidae</i>
GC133												no determinazione
GC134												no determinazione
GC136	1105.6		1427.7	1550.8			2145.1	2883.4				<i>Equus sp.</i>
GC137												no determinazione
GC138	1105.6		1427.7					2883.4				Ungulata
GC140	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4				<i>Cervidae/Equus sp.</i>
GC141	1105.6		1427.7					2883.4	2899.4			Ungulata
GC142	1105.6		1427.7		1648.8		2145.1	2883.4	2899.4			<i>Equus sp.</i>
GC143	1105.6		1427.7					2883.4				Ungulata
GC144	1105.6		1427.7		1648.8			2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC145	1105.6		1427.7		1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC146												no determinazione
GC147	1105.6		1427.7		1648.8			2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC148												no determinazione
GC149	1105.6		1427.7		1648.8		2131.1	2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC151	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4				<i>Cervidae/Equus sp.</i>
GC152												no determinazione
GC153	1105.6		1427.7					2883.4				Ungulata
GC154	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4				<i>Cervidae/Equus sp.</i>
GC155												no determinazione
GC156	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8		2131.1	2883.4				<i>Cervidae</i>
GC157	1105.6		1427.7				2131.1	2883.4				<i>Ovis-Caprinae/Cervidae</i>
GC158	1105.6		1427.7		1648.8			2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC159	1105.6		1427.7					2883.4				Ungulata
GC160												no determinazione
GC161												no determinazione
GC162												no determinazione
GC163												no determinazione
GC164	1105.6		1427.7				2145.1	2883.4				<i>Equus sp.</i>
GC165												no determinazione
GC166	1105.6		1427.7									Ungulata
GC167	1105.6		1427.7					2883.4				Ungulata
GC168	1105.6		1427.7					2883.4				Ungulata
GC169												no determinazione
GC170	1105.6		1427.7					2883.4				Ungulata
GC171	1105.6		1427.7		1648.8			2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC172	1105.6		1427.7	1550.8				2883.4	2899.4			<i>Cervidae</i>
GC173	1105.6		1427.7					2853.4				<i>Bos/Bison</i>
GC174												no determinazione
GC175												no determinazione
GC176												no determinazione
GC177												no determinazione

Tabella 18. Marcatori peptidici individuati con le analisi ZooMS e determinazioni tassonomiche dei campioni del livello uluziano di Grotta del Cavallo.

2. Teixoneres

2.1 Il sito

La grotta di Teixoneres si trova in Catalogna, vicino alla città di Moià (Barcellona, Spagna) ad un'altitudine di circa 760 m s.l.m. Da un punto di vista geomorfologico, la regione forma parte degli altopiani situati tra due fiumi molto importanti, il Llobregat a Sud e il Ter a Nord, che collegano l'area interna della parte settentrionale della Catalogna con il Mar Mediterraneo. Un gruppo speleologico locale scoprì la grotta di Teixoneres nel 1950 (Rosell et al., 2017; Serrat & Albert, 1973; Guilaine et al., 1982). Sulla scia di questa scoperta, diverse stagioni di ricerca archeologica sono state effettuate e la maggior parte di esse sono state condotte nella prima metà degli anni '50 e nella prima metà degli anni '70. La formazione della grotta di Teixoneres è legata al sistema di drenaggio del fiume Torrent del Mal, ed è il risultato dell'evoluzione di un sistema carsico. La grotta, situata all'incirca a 15 m sopra l'attuale pianura alluvionale, mostra una morfologia a forma di U con una lunghezza approssimativa di 30 m. La grotta è stata divisa in tre diverse camere, denominate X, Y e Z (Serrat e Albert, 1973). La camera X, la galleria più grande, che è lunga 30 m e larga 5-6 m, si trova nella zona occidentale e costituisce il principale ingresso alla grotta. Questa camera forma una galleria orientata in senso nord-sud. La grotta è riempita da un pacchetto di sedimenti di 6 m di spessore, per il quale sono state descritte diverse unità stratigrafiche. I primi studi stratigrafici della grotta di Teixoneres sono iniziati negli anni '50 e furono condotti da Serra-Ràfols et al., che definì 15 unità litografiche nella camera X. Successivamente, Talamo et al. 2016b hanno descritto la parte superiore della sequenza attraverso un nuovo profilo stratigrafico e ridefinito quattro unità litostratigrafiche (I-IV) e due sottounità per le unità II e III rispettivamente (II-a, II-b, III-a e III-b). Questi studi geologici precedenti e scavi estensivi del sito (Rosell et al., 2010; Serrat & Albert, 1973; Serra-Ràfols et al., 1957; Talamo et al., 2016b), hanno permesso di definire ad oggi, otto unità litografiche e 18 sottounità: Unità I (I e I-a1); Unità II (II-a1, II-a2, II-b1, II-b2 e II-b3); Unità III (III-a1, III-a2, III-b1, III-b2, III-c, III-d); Unità IV; Unità V (V-a, V-b e V-c); Unità VI (VI-a e VI-b); Unità VII e unità VIII. Una serie di campioni U-Th ottenuti per la stalagmite dell'unità IV ha prodotto un'età media di 100.3 ± 6.1 mila anni fa, collocando questa unità nel MIS 5c, mentre l'unità I corrisponde probabilmente al MIS 2, tra 14 e 16 mila anni fa (Ochando et al., 2020; Tissoux et al., 2016). La presenza di *Hystrix* sp. e *Iberomys cabreræ* nell'Unità III (sottounità III-b) indica un'età biocronologica per questa unità compresa tra ~90 e 60 mila anni fa (López-García et al., 2012). Sono state effettuate anche datazioni al

radiocarbonio su ossa animali, alcune anche modificate dall'uomo che indicano una presenza umana nell'Unità III tra 51,000 e 44,210 anni fa cal BP.

2.2 Insieme faunistico

L'insieme dei resti di mammiferi rinvenuti comprende 27353 elementi (2697 nell'unità II e 24656 nell'unità III). La maggior parte dei fossili risulta fortemente frammentata, di conseguenza è stato possibile identificare a livello tassonomico soltanto il 5.4 % dei resti analizzati. Il numero di campioni identificati di mammiferi di grandi dimensioni è 1465 (323 nell'unità II e 1142 nell'unità III), di cui 1263 sono ungulati (257 nell'unità II e 1006 nell'unità III). L'elenco dei mammiferi comprende *Ursus spelaeus*, *Canis lupus*, *Vulpes vulpes*, *Lynx* sp., *Crocuta crocuta*, *Meles meles*, *Cervus elaphus*, *Capreolus capreolus*, *Bos primigenius*, *Rupicapra pyrenaica*, *Capra pyrenaica*, *Sus scrofa*, *Equus Ferus*, *Equus hydruntinus*, *Coelodonta antiquitatis* e *Mammuthus primigenius* (Alvarez-Lao et al., 2016; Rosell Ardèvol et al., 2010).

Le analisi proteomiche sono state effettuate su campioni provenienti dall'Unità III. Di conseguenza sono stati presi in considerazione i dati archeozoologici relativi a questa unità (tabella 19).

In termini di NISP, la classe più abbondante risulta essere quella dei leporidi (488). Passando agli ungulati, il *Cervus elaphus* è la specie in assoluto più numerosa, seguita dai cervidi generici (categoria all'interno della quale sono stati inseriti tutti quei campioni per cui era impossibile la distinzione tra *Cervus elaphus* e *Capreolus capreolus*). Molto consistente anche la presenza degli equidi, mentre molto meno numerosi sono i resti di bovidi indeterminati e di *Bos/Bison*. Da notare la presenza di animali di grandissima taglia come il *Mammuthus primigenius* e il *Coleodonta antiquitatis*. Scarsi sono invece i resti di *Sus scrofa* e di *Rupicapra pyrenaica* come anche di roditori come il castoreo e l'istrice. I mustelidi sono rappresentati da pochissimi frammenti ossei di tasso mentre consistente è la presenza tra i carnivori di *Ursus spelaeus*, della lince e della iena. Tra i canidi, i resti di volpe e di lupo sono molto scarsi.

In base alla composizione della fauna si può tentare di ricostruire il clima e l'ambiente che caratterizzavano questa grotta durante il MIS3. La presenza di due specie adattate al clima freddo come *Mammuthus primigenius* e *Coleodonta antiquitatis*, indicano un ambiente freddo e arido. Gli ungulati identificati in associazione alla grotta di Teixoneres delineano un ambiente

complesso composto da diversi ecosistemi. Gli equidi suggeriscono la presenza di praterie aperte erbose mentre i cervi rossi indicano aree boschive a ridosso della grotta, dato supportato anche dalla presenza di *Sus scrofa* e *Capreolus capreolus*. Inoltre, ci sono due specie collegate alla presenza di zone rocciose di montagna intorno al sito, in particolare *Rupicapra pyrenaica* e *Capra pyrenaica* (Álvarez-Lao et al., 2017). Questo paesaggio è coerente con i dati dedotti dalle analisi polliniche, dei carboni, della microfauna e dall'analisi dell'usura dentale dei grandi mammiferi (López-García et al., 2012).

Taxa	Subunità			US III Totale NISP
	III-a1 NISP	III-a2 NISP	III-b NISP	
<i>Castor</i> sp.			1	1
<i>Hystrix</i> sp.	7		7	14
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1	1	4	6
Leporidae	170	19	299	488
<i>Vulpes vulpes</i>			1	1
<i>Ursus spelaeus</i>	51	21	20	92
<i>Canis lupus</i>			2	2
<i>Lynx</i> sp.	8		9	17
<i>Crocuta crocuta</i>	9	5	5	19
<i>Meles meles</i>	4			4
Totale Carnivora	15	2	38	55
<i>Mammuthus primigenius</i>	1			1
<i>Coleodonta antiquitatis</i>	7	2	5	14
<i>Sus scrofa</i>	4		3	7
<i>Equus</i> sp.	160	29	189	378
<i>Bos/Bison</i>	5	7	28	40
Bovidae indet.	19	1	25	45
<i>Capra pyrenaica</i>	1	1	10	12
<i>Rupicapra pyrenaica</i>	3	2	1	6
Caprinae	3		9	12
<i>Cervus elaphus</i>	112	18	447	577
<i>Capreolus capreolus</i>	10	7	68	85
Cervidae	74	15	398	487
mamm.piccola taglia	318	187	5201	5706
mamm. media taglia	624	278	4483	5385
mamm.grande taglia	90	45	1032	1167
Resti indeterminati	6317	903	12273	19493
Totale NISP	8031	1544	24585	34160

Tabella 19. Composizione della fauna nell'Unità III del sito di Teixoneres (Zilio et al., 2021).

2.3 Materiali analisi proteomiche (ZooMS)

L'indagine tramite ZooMS si è concentrata sull'unità III in cui durante il MIS3 sono state individuate delle frequenti occupazioni del sito da parte di diversi gruppi umani (Rosell Ardèvol et al., 2010).

Sono stati inviati presso il BONES Lab del Dipartimento di Beni Culturali di Ravenna 275 campioni. Ogni singolo frammento osseo è stato esaminato dal punto di vista morfologico sottoponendolo ad archeozoologi e antropologi, con l'obiettivo di isolare i campioni con caratteristiche compatibili con l'osso umano. Sono stati infine selezionati 5 campioni, esclusi dalle analisi proteomiche, per essere sottoposti direttamente alle analisi genetiche.

Per tutti gli altri frammenti ossei, inizialmente, è stato estratto il collagene utilizzando il protocollo van Doorn (2011), successivamente, dal momento che la qualità degli spettri non era ottimale, si è proceduto con il protocollo di Buckley et al. (2009), con previa demineralizzazione tramite HCl.

Il campione denominato TX103 è stato analizzato una seconda volta tramite LC-MS/MS seguendo lo stesso protocollo di estrazione utilizzato per lo spettrometro MALDI. Sono state aggiunte inoltre una fase di riduzione dei ponti disolfuro con DTT (10mM) e di alchilazione delle cisteine con iodoacetammide (55mM) prima della digestione in tripsina. Il campione è stato poi inviato al Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche dell'Università di Modena dove è stato risospeso con una soluzione di acqua: acetonitrile e acido formico (95:3:2) prima di essere caricato nell'LC-MS/MS. Le analisi sono state eseguite utilizzando un Dionex Ultimate 3000 UHPLC abbinato a uno spettrometro di massa ad alta risoluzione Q Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Per il campione è stato scelto un tempo di corsa pari a 90 minuti.

I raw data sono poi stati convertiti in formato mgf e cercati tramite Mascot contro SwissProt (ristretto al taxon Mammalia, 66943 sequenze) e cRAP (116 sequenze di possibili contaminanti). I parametri di ricerca sono riassunti nella tabella 20.

Enzyme	Trypsin
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications	Deamidated (NQ),Oxidation (M),Oxidation (P)
Mass values	Monoisotopic
Protein mass	Unrestricted
Peptide mass tolerance	10 ppm
Fragment mass tolerance	0.02 Da

Max missed cleavages	1
----------------------	---

Tabella 20. Parametri di ricerca impostati per la ricerca in database.

2.4 Risultati ZooMS

Dei 275 campioni analizzati, 249 hanno dato informazioni utili dal punto di vista tassonomico. 21 non hanno fornito dati di nessun tipo, 10 solo informazioni legate alla presenza di collagene all'interno del campione (dato ricavabile dalla presenza del peptide 1105.6). 171 campioni sono stati identificati come cervidi (senza poter distinguere tra *Capreolus capreolus* e *Cervus elaphus*); 11 *Bos/Bison*, 17 *Equus* sp., 2 *Sus scrofa*, 15 ungulati e 2 carnivori generici di cui uno dubbio perché nello spettro era presente un unico peptide (1453.7) in comune con *Sus scrofa* e *Coleodonta antiquitatis*. I restanti campioni rientrano in categorie più circoscritte rispetto a quella di ungulati generici come ad esempio ovicaprini, bovidi, cervidi e equidi che non sono stati identificati in maniera più puntuale per mancanza di marcatori peptidici all'interno dello spettro (tabella 21).

In seguito all'impiego del protocollo con demineralizzazione (Buckley et al., 2009), gli spettri ottenuti sono risultati più chiari e leggibili ed è stato possibile determinare molti più campioni che precedentemente non avevano dato risultati. Inoltre, per altri frammenti ossei è stato possibile effettuare una determinazione tassonomica più specifica passando dalla definizione generica di ungulato all'identificazione della famiglia o della specie.

I risultati ottenuti dall'estrazione del collagene sono in linea con i dati archeozoologici. Anche tramite le analisi proteomiche si conferma come componente preponderante quella dei cervidi seguiti da equidi, bovidi e cinghiali. L'assenza di carnivori, che sono comunque abbastanza numerosi nel record faunistico, trova forse spiegazione nella fase di selezione dei campioni che però è stata eseguita da un altro laboratorio e da altri operatori.

Per quanto riguarda l'assenza di resti identificati come leporidi, si può ipotizzare che anche questa assenza, possa esser dovuta ai criteri adottati in fase di selezione dei campioni. Dato che l'obiettivo delle analisi era quello di individuare un resto umano, solo i campioni che si presentavano compatibili con esso sono stati scelti. I leporidi presentano delle morfologie e dimensioni molto diverse da quelle umane.

ID. Lab	P1	A	A'	B	C	P2	D	E	F	F'	G	G'	ZooMS identification
TX1													DNA (<i>Equus</i> sp.)
TX2	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX3	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX4	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX5	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1						<i>Ovis</i> - Caprinae/Cervidae/Bovidae
TX6	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX7	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX8	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8							Cervidae
TX9	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8							Cervidae
TX10	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX11	1105.6			1427.7									Ungulata
TX12	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8							Bovidae/ <i>Ovis</i> -Caprinae
TX13	1105.6			1427.7									Ungulata
TX14	1105.6			1453.7									Carnivora (Mustelidae/Felidae)
TX15	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8			2883.4				Cervidae
TX16	1105.6			1427.7									Ungulata
TX17	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8							Bovidae/ <i>Ovis</i> -Caprinae
TX18	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8			2853.4				<i>Bos</i> / <i>Bison</i>
TX19	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1						Cervidae/ <i>Ovis</i> - Caprinae/Bovidae
TX20	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX21	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX22	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX23	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX24	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX25	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX26	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX27	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX28	1105.6			1427.7	1550.8								Cervidae/ <i>Equus</i> sp.
TX29	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX30	1105.6			1427.7			2145.1						<i>Equus</i> sp.
TX31	1105.6												no determinazione
TX32	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae/ <i>Ovis</i> -Caprinae
TX33	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX34	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX35													no determinazione
TX36	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX37	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX38	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX39	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX40	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8							Cervidae
TX41	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX42	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX43	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX44	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX45	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX46	1105.6			1427.7			2131.1		2883.4				Cervidae/ <i>Ovis</i> -Caprinae
TX47	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae
TX48	1105.6			1427.7									Ungulata
TX49	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX50	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4				Cervidae
TX51	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1						Cervidae

TX161	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX162	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX163	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX164	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX165	1105.6			1427.7		1648.8						<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX166	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX167												DNA (Modern <i>Homo/Sus scrofa</i>)
TX168	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX169	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1		2883.4			<i>Ovis-Caprinae/Cervidae</i>
TX170	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX171	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX172	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1					Cervidae
TX173	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8	2131.1					<i>Ovis-Caprinae/Bovidae</i>
TX174	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX175	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1					Cervidae
TX176	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX177	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX178	1105.6			1427.7	1550.8		2145.1					<i>Equus sp.</i>
TX179	1105.6											no determinazione
TX180	1105.6											no determinazione
TX181	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX182	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX183	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX184	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX185	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX186	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1					Cervidae
TX187	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX188	1105.6			1453.7								Carnivora/ <i>Sus scrofa/Coleodonta antiquitatis</i>
TX189												no determinazione
TX190	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX191	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1					Cervidae
TX192	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1					<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX193	1105.6			1427.7		1648.8						<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX194	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX195	1105.6			1427.7		1648.8						<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX196	1105.6			1427.7								Ungulata
TX197	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1		2883.4			<i>Ovis-Caprinae/Cervidae</i>
TX198	1105.6			1427.7								Ungulata
TX199	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX200	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX201	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1					<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX202	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1					<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX203	1105.6			1427.7	1550.8		2145.1		2883.4			<i>Equus sp.</i>
TX204	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX205	1105.6			1427.7		1648.8						<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX206	1105.6			1427.7		1648.8						Cervidae
TX207	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae

TX208	1105.6		1427.7		1648.8						<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX209	1105.6										no determinazione
TX210	1105.6										no determinazione
TX211	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX212	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX213											no determinazione
TX214	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX215	1105.6		1427.7	1550.8		2145.1		2883.4			<i>Equus sp.</i>
TX216	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8	2131.1		2853.4			<i>Bos/Bison</i>
TX217	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX218	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX219	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8	2131.1		2853.4			<i>Bos/Bison</i>
TX220	1105.6										no determinazione
TX221	1105.6		1427.7		1648.8			2853.4			<i>Bos/Bison</i>
TX222	1105.6		1427.7		1648.8						<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX223	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX224	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8	2131.1		2853.4			<i>Bos/Bison</i>
TX225	1105.6		1427.7		1648.8						<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX226	1105.6		1427.7								Ungulata
TX227	1105.6		1427.7								Ungulata
TX228	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX229											no determinazione
TX230											no determinazione
TX231	1105.6		1427.7		1648.8	2131.1		2883.4			<i>Ovis-Caprinae/Cervidae</i>
TX232	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX233	1105.6		1453.7	1550.8							<i>Sus scrofa/Coleodonta antiquitatis</i>
TX234	1105.6										no determinazione
TX235	1105.6		1427.7	1550.8		2145.1		2883.4			<i>Equus sp.</i>
TX236	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX237	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX238	1105.6		1427.7	1550.8		2145.1		2883.4			<i>Equus sp.</i>
TX239	1105.6		1427.7			2145.1					<i>Equus sp.</i>
TX240	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX241	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX242	1105.6		1427.7								Ungulata
TX243											no determinazione
TX244	1105.6		1453.7								<i>Carnivora/Sus scrofa/Coleodonta antiquitatis</i>
TX245	1105.6		1427.7								Ungulata
TX246	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX247	1105.6		1427.7								Ungulata
TX248	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX249	1105.6		1427.7								Ungulata
TX250	1105.6		1427.7								Ungulata
TX251	1105.6		1427.7								Ungulata
TX252	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX253	1105.6		1427.7			2131.1					<i>Ovis-Caprinae/Cervidae/Bovidae</i>
TX254	1105.6		1427.7	1550.8	1648.8	2131.1		2883.4			Cervidae
TX255	1105.6		1427.7	1580.8	1648.8	2131.1		2853.4			<i>Bos/Bison</i>
TX256	1105.6		1427.7	1550.8		2145.1		2883.4			<i>Equus sp.</i>

TX257	1105.6											no determinazione
TX258	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1					Ovis- Caprinae/Cervidae/Bovidae
TX259	1105.6			1427.7	1550.8		2145.1			2899.4		<i>Equus</i> sp.
TX260	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX261	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX262	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX263	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX264	1105.6			1427.7	1580.8	1648.8	2131.1			2853.4		<i>Bos/Bison</i>
TX265	1105.6											no determinazione
TX266	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX267	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX268	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1					Ovis- Caprinae/Cervidae/Bovidae
TX269	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX270	1105.6			1427.7			2131.1					Ovis- Caprinae/Cervidae/Bovidae
TX271	1105.6			1427.7		1648.8						Ovis- Caprinae/Cervidae/Bovidae
TX272	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX273	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX274	1105.6			1453.7			2131.1			2883.4		<i>Sus scrofa</i>
TX275	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX276												no determinazione
TX277	1105.6			1427.7	1550.8	1648.8	2131.1			2883.4		Cervidae
TX278												no determinazione
TX279	1105.6			1427.7		1648.8	2131.1			2883.4		Ovis-Caprinae/Cervidae
TX280	1105.6			1427.7								Ungulata

Tabella 21. Marcatori peptidici individuati con le analisi ZooMS e determinazioni tassonomiche dei campioni dell'Unità III di Teixoneres.

La discreta conservazione del collagene in questo sito ha permesso di ottenere informazioni tassonomiche dalla maggior parte dei campioni sottoposti ad analisi. Infatti, un frammento osseo (TX103) è stato riconosciuto tramite screening con la tecnica ZooMS come appartenente alla superfamiglia Hominoidea. Sono stati infatti riscontrati diversi peptidi diagnostici legati a questa specie (1235.6; 1477.8; 1580.8; 2115.1; 2832.4; 2869.4) (Brown et al., 2016) (figura 22).

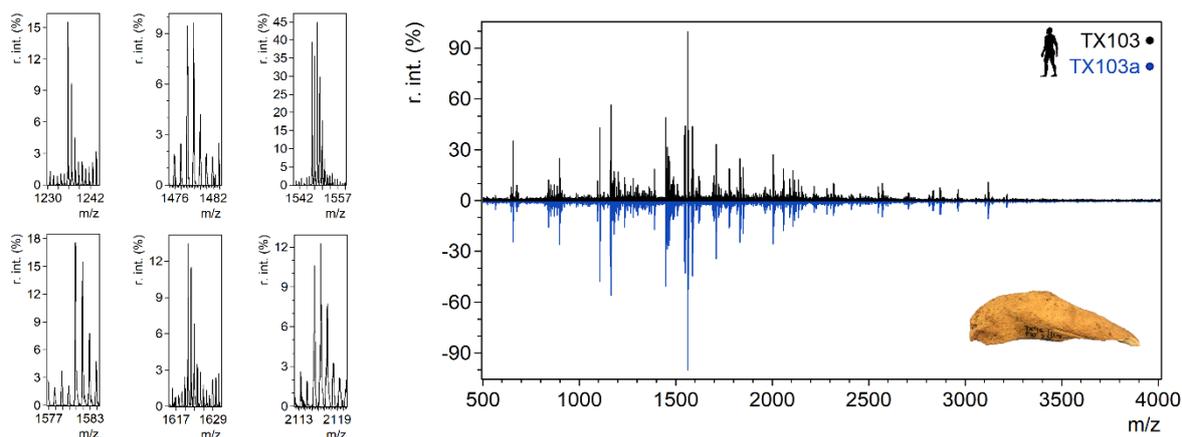


Figura 22. Spettro del campione TX103 con i peptidi diagnostici del taxon Hominoidea. Un'immagine del frammento osseo (lunghezza approssimativa 5 cm) è riportata in figura.

2.5 Risultati analisi LC-MS/MS

Per avere conferma dell'attribuzione tassonomica ad *Homo* sp., il campione TX103 è stato riestratto e sequenziato tramite LC-MS/MS. I risultati, riportati nella tabella 22, mostrano la presenza di collagene (CO1A1, CO1A2) e di tripsina (TRYP_PIG), ove quest'ultima è residuo della digestione enzimatica. L'elevato grado di deamidazione del collagene (N e Q) ne conferma l'origine antica e quindi probabilmente endogena. La ricerca contro il database cRAP ha evidenziato l'assenza di contaminazioni durante l'estrazione in laboratorio. Diverse sequenze uniche, riconducibili al solo collagene umano sono state riscontrate tramite la ricerca contro SwissProt. In particolare, grazie alla combinazione di diversi peptidi unici di COL1A2 (e.g. GLHGEFGLPGPAGPR, GEIGAVGNAGPAGPAGPR, GLPGVAGAVGEPGPLGIAGPPGAR e AGVMGPPGSR; vedi figura 23) è stato possibile ottenere l'identificazione tassonomica al genere *Homo* (Brown et al., 2016), escludendo altri primati tassonomicamente vicini come *Pan* e *Gorilla*.

Database	Accession	Score	Mass	Num. of matches	Num. of significant matches	Num. of sequences	Num. of significant sequences
SwissProt	CO1A1_HUMAN	7872	139883	403	403	46	46
SwissProt	CO1A1_TAPTE	5173	85583	313	313	40	40
SwissProt	CO1A1_CYCDI	4097	75229	208	208	23	23
SwissProt	CO1A1_MOUSE	2920	138974	176	176	22	22
SwissProt	CO1A2_HUMAN	2815	129749	146	146	35	35
SwissProt	CO1A2_CYCDI	586	74917	40	40	10	10
SwissProt	CO1A2_EQUSP	561	80791	47	47	13	13
SwissProt	TRYP_PIG	125	25078	5	5	2	2

Tabella 22. Risultati della ricerca in database che evidenziano la presenza di collagene (CO1A1, CO1A2) e di tripsina (TRY_PIG), residuo della digestione enzimatica.

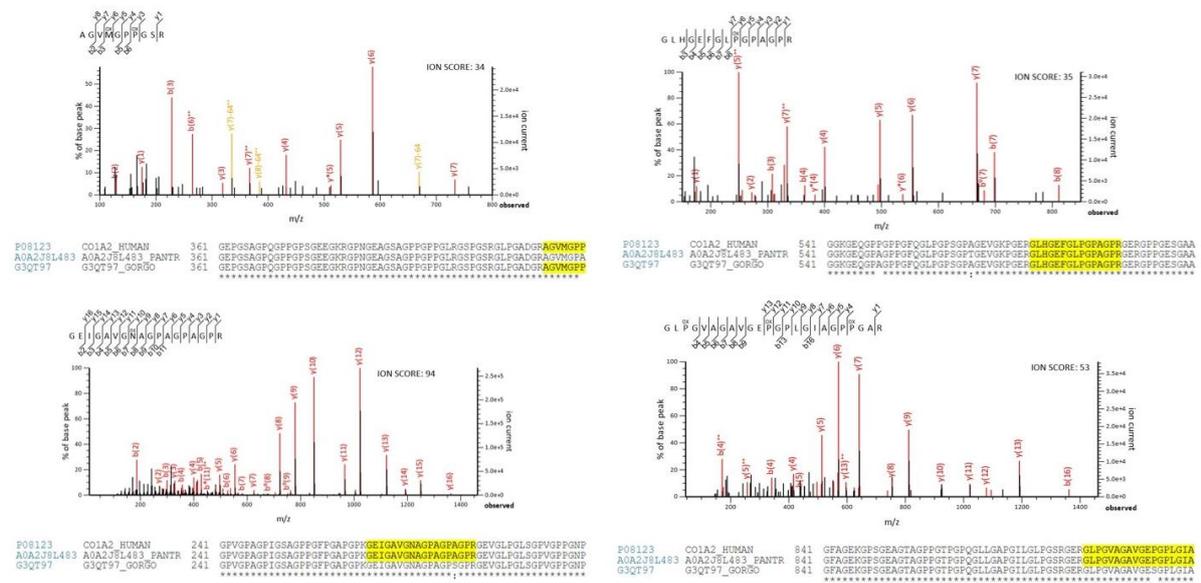


Figura 23. Peptidi unici di COL1A2 (e.g. GLHGEFGLPGAGPR, GEIGAVGNAGPAGPR, GLPGVAVGEPGLGIAGPPGAR e AGVMGPPGSR) presenti nel campione TX103. Le sequenze aminoacidiche di *Homo sapiens*, *Pan troglodytes* e *Gorilla gorilla* sono messe a confronto per evidenziare che, quando combinati, questi specifici peptidi identificano inequivocabilmente *Homo sp.*

Discussione e Conclusioni

La ZooMS si è dimostrata molto utile in entrambe le applicazioni sperimentate, sia per apportare maggiori informazioni riguardanti la composizione della fauna dei siti presi in esame, sia come metodo di pre-screening in contesti con resti particolarmente frammentati e con probabilità di individuare un reperto umano.

Per quanto riguarda la prima applicazione, in tutti i siti i risultati proteomici si sono rivelati coerenti con quelli dell'archeozoologia tradizionale, apportando anche delle informazioni in più riguardo allo sfruttamento di alcune specie da parte dell'uomo.

Dai risultati ottenuti si possono delineare delle differenze tra i diversi siti analizzati.

Gli spettri di maggior qualità sono quelli ottenuti per il sito di Teixoneris e del Riparo del Broion, ma anche, nonostante si tratti di un sito del Sud Italia, per il livello uluzziano di Rocca San Sebastiano. Situazione completamente diversa in termini di qualità e leggibilità degli spettri, si delinea per Uluzzo C (figura 24), i cui campioni sottoposti ad analisi si presentavano particolarmente disidratati e concrezionati, con evidente stato tafonomico compromesso da vari fattori diagenetici. È noto che la perdita di collagene in un campione osseo è legata a vari fattori come il tempo trascorso, la temperatura, l'umidità ambientale e il pH del sedimento.

Temperature e pH estremi possono infatti accelerare l'idrolisi della proteina (Collins et al., 2002). Inoltre, la decomposizione microbica dell'osso può essere fortemente influenzata da fattori che riguardano l'ambiente di sepoltura come l'ossigeno o la presenza di acqua (Painter, 1991). Questo potrebbe spiegare la scarsità di collagene riscontrata e la percentuale molto alta di frammenti indeterminati (più del 50%) nei contesti di Uluzzo C e Grotta del Cavallo, entrambi siti del Sud Italia posizionati a ridosso del mare (figura 24).

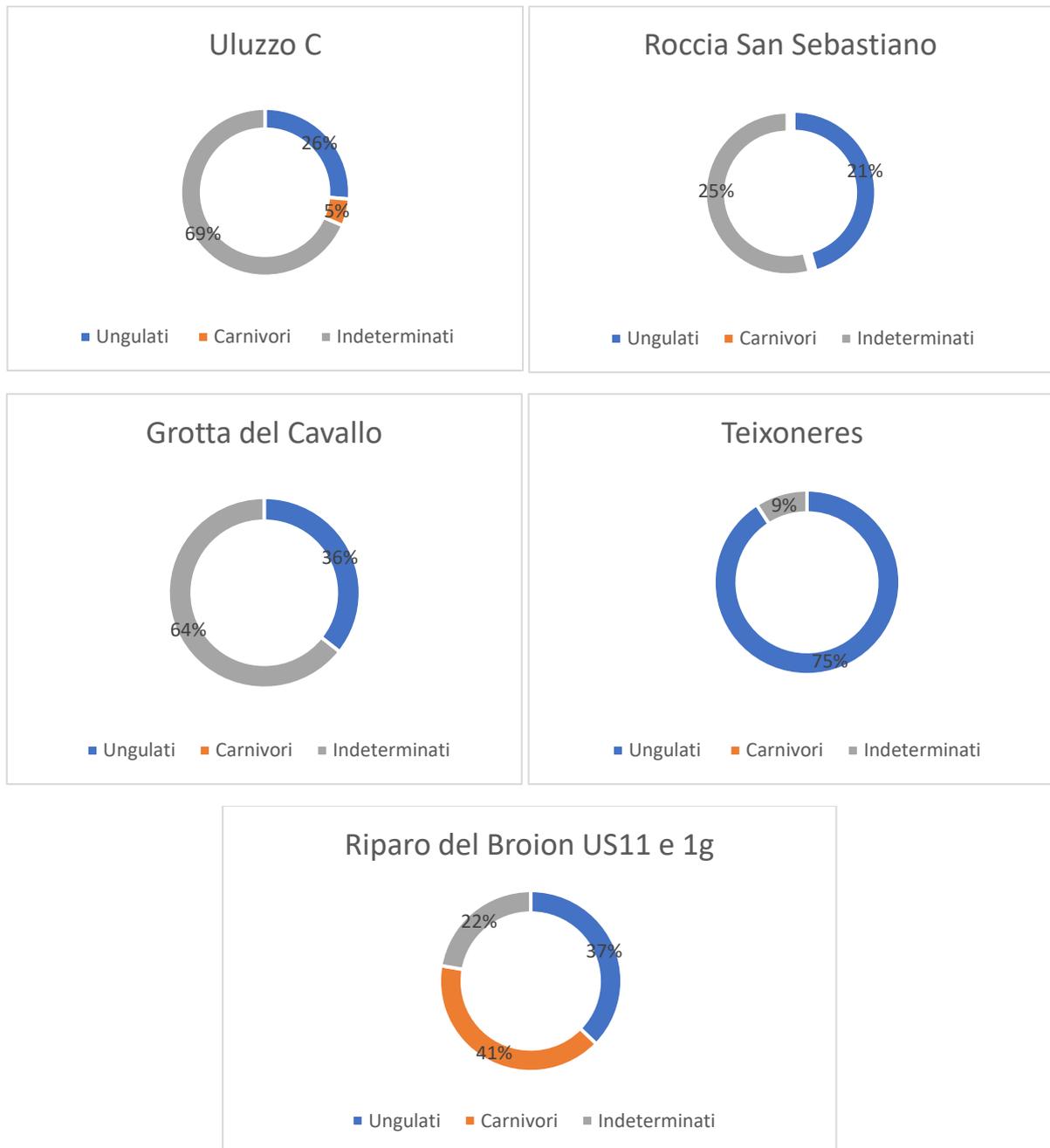


Figura 24. Confronto dei risultati ottenuti con la ZooMS di tutti i contesti presi in esame

La percentuale di deamidazione è stata ottenuta analizzando gli stessi spettri generati dallo spettrometro MALDI-ToF su cui si sono identificati tassonomicamente i campioni. La

deamidazione del collagene di tipo I è stata proposta come i) metodo di datazione relativa per stabilire la relazione cronologica tra campioni che derivano da contesti archeologici differenti o diverse unità stratigrafiche (Chen et al., 2019; Ramsøe et al., 2020; van Doorn et al., 2012; Wilson et al., 2012) ii) determinare l'omogeneità di un insieme di campioni iii) stabilire il tasso di degradazione o di preservazione del collagene (Chen et al., 2019; Sinet-Mathiot et al., 2019; Welker et al., 2017).

Per ottenere la percentuale di deamidazione dei campioni sono stati analizzati i peptidi 1105.6 e 1706.7 perchè possiedono una sequenza amminoacidica primaria identica tra le diverse specie prese in considerazione in questo studio (Welker et al., 2016). Il primo peptide, ad esempio, che contiene una glutamina che può deamidare, è stato identificato a 1105.6 m/z (il non deamidato) e a 1106.5 m/z (il deamidato). Il rapporto tra le intensità dei picchi a 1105.6 e 1106.5 permette di quantificare il livello relativo di deamidazione in un campione ottenendo informazioni sulla sua età relativa e sulla qualità del collagene preservato (van Doorn et al., 2012, Wilson et al., 2012). Il calcolo del rapporto di deamidazione è stato effettuato tramite il pacchetto *R q2e* (Wilson et al., 2012), che include la deconvoluzione del pattern isotopico.

È opportuno sottolineare che i campioni considerati nel calcolo, non sono stati sottoposti tutti allo stesso protocollo di estrazione. Si è sempre tentato come prima soluzione di applicare il protocollo che prevede la sola estrazione con ammonio bicarbonato (van Doorn, 2011), ma poiché i primi risultati non erano molto soddisfacenti, per Uluzzo C, Grotta del Cavallo, Riparo del Broion e Teixoneres si è proceduto successivamente con il protocollo di Buckley et al. che, prevedendo una fase di demineralizzazione dei campioni, potrebbe aver influenzato i risultati inducendo il processo di deamidazione (Ren et al., 2009; Hao et al., 2011; Simpson et al., 2016).

Nell'articolo di Brown et al., 2021, il calcolo della deamidazione è stato effettuato su 2459 reperti ossei provenienti dal sito di Grotta Denisova per evidenziare delle potenziali differenze tra gli strati corrispondenti a cronologie diverse. I risultati ottenuti rivelano che la variabilità all'interno dello stesso strato è così alta da impedire il riconoscimento di un pattern di deamidazione perché sono presenti troppi fattori che possono influenzare questo dato, legati soprattutto all'ambiente di sepoltura di ogni singolo reperto. Nel presente studio invece, avendo riscontrato delle evidenti differenze nell'ottenimento e nella qualità dei dati tassonomici dai diversi contesti, sono state tratte delle considerazioni comparando i dati non dei singoli frammenti ossei (intra-sito) ma dei singoli siti (inter-sito). Si è voluto verificare se, anche dal punto di vista della deamidazione, fosse possibile delineare delle differenze. In effetti, la

scarsità dei risultati ottenuti per contesti come Grotta del Cavallo e Uluzzo C rispetto al sito del Riparo del Broion, si rispecchia nella percentuale di deamidazione ottenuta. Nei grafici sottostanti (figura 25) che mostrano la percentuale di deamidazione per i due diversi peptidi P1105.6 e P1706.7 dove il valore 0 indica un campione completamente deamidato e 1 per nulla deamidato, si evince che tutti i contesti analizzati si attestano su una percentuale di deamidazione (%Gln) tra 0.27 e 0.38 per il peptide P1105.6 e tra 0.21 e 0.33 per il peptide P1706.7. Questo valore indica campioni particolarmente deamidati, se si prendono in considerazione i risultati ottenuti per Grotta Denisova (%Gln tra 0.4 e 0.8) (Brown et al., 2021). Per entrambi i peptidi analizzati, il contesto con deamidazione media più elevata è Teixonerres (P1105.6: 0.27 ± 0.009 ; P1706.7: 0.21 ± 0.007), di cui sono stati analizzati i reperti ossei provenienti da un livello datato tra 51,000 e 44,210 anni fa cal BP. Seguono poi Uluzzo C (P1105.6: 0.29 ± 0.02 ; P1706.7: 0.2 ± 0.03), Grotta del Cavallo (P1105.6: 0.33 ± 0.02 ; P1706.7: 0.24 ± 0.01), Roccia San Sebastiano (P1105.6: 0.33 ± 0.01 ; P1706.7: 0.21 ± 0.01) e per ultimo il Riparo del Broion (P1105.6: 0.38 ± 0.01 ; P1706.7: 0.33 ± 0.01), che risulta essere l'unico contesto analizzato collocato nel Nord Italia.

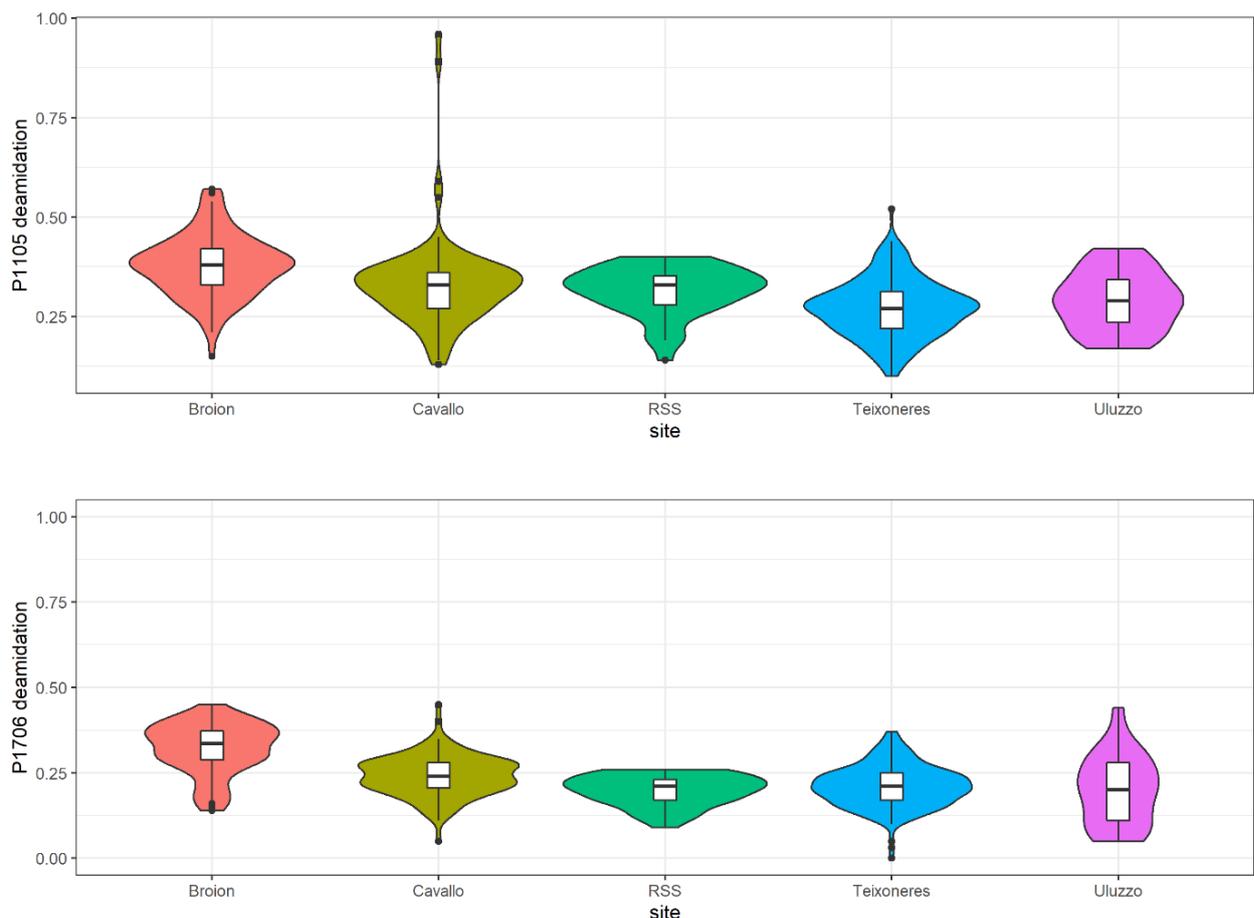


Figura 25. Violin plots con percentuali di deamidazione dei peptidi P1105 e P1706, calcolata per i diversi siti archeologici

I dati ottenuti dal calcolo della deamidazione sono in linea con ciò che è emerso dalla qualità dei risultati delle determinazioni tassonomiche (tabella 23).

Siti	P1105.6			P1706.7			success rate %
	median	mean	2se	median	mean	2se	
Riparo del Broion	0,38	0,377957	0,013661	0,335	0,321618	0,01308	90,8
Grotta del Cavallo	0,33	0,331474	0,021186	0,24	0,241215	0,011057	45,2
Roccia San Sebastiano	0,33	0,315	0,018546	0,21	0,198649	0,013586	74,5
Teixoneres	0,27	0,271034	0,009214	0,21	0,211455	0,007831	90,5
Uluzzo C	0,29	0,29	0,023911	0,2	0,199524	0,033474	36,9

Tabella 23: Medie di deamidazione per i due peptidi presi in considerazione (P1105.6 e P1706.7) con rispettivo errore (2se) e tasso di successo nella determinazione tassonomica tramite ZooMS per tutti i contesti analizzati.

Mettendo in relazione la percentuale di deamidazione nei vari contesti e il tasso di successo nelle determinazioni ottenute (figura 26), si può notare che il contesto di Uluzzo C, nel quale la media di deamidazione dei campioni risulta particolarmente alta (0.29 ± 0.02 e 0.2 ± 0.03), ha restituito un bassissimo tasso di successo nella determinazione tassonomica dei campioni attraverso l'analisi del collagene. Molto interessante il caso del sito di Teixoneres, caratterizzato da un tasso di successo molto alto, nonostante la percentuale elevata di deamidazione dei suoi campioni. Probabilmente, mentre il secondo dato è correlato all'antichità dello strato analizzato, il primo è conseguente alle buone condizioni ambientali di sepoltura, che hanno perciò contribuito a preservare il collagene dei frammenti ossei nonostante il tempo. Nel caso invece del sito di Grotta del Cavallo, si possono notare alcuni outliers (figura 25), probabilmente legati alla presenza di contaminanti moderni poco o per nulla deamidati che hanno influito anche sulla corretta e univoca interpretazione dello spettro al momento dell'identificazione tassonomica.

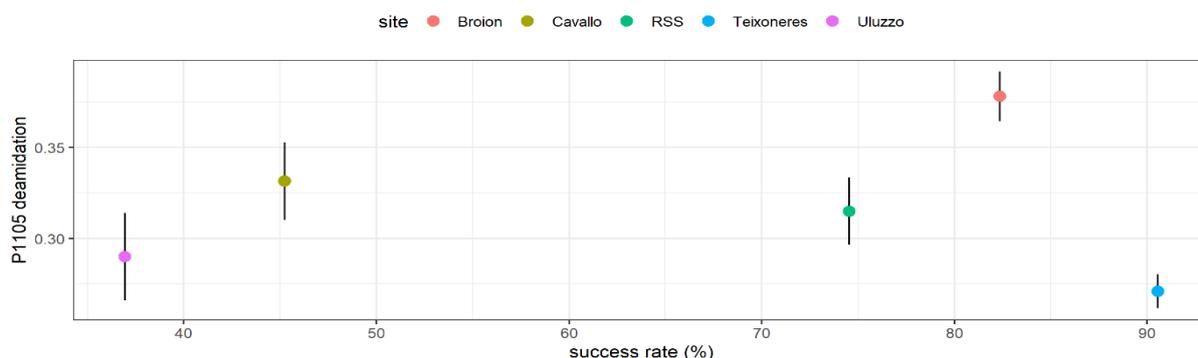


Figura 26: Grafico che rappresenta il tasso di deamidazione del peptide P1105 in relazione al tasso di successo nelle determinazioni tassonomiche ZooMS per i vari contesti analizzati. Le barre di errore rappresentano un intervallo di confidenza del 95%.

Dai risultati ottenuti da questi contesti, appare evidente che la combinazione dello studio archeozoologico con le analisi proteomiche permetta di approcciarsi all'interpretazione del contesto in maniera più consapevole e di limitare le analisi ZooMS soltanto a quei campioni che rispondono a determinate caratteristiche morfologiche.

Per quanto riguarda la seconda applicazione, tale tecnica può essere utile per effettuare una prima indagine ed indirizzare le future analisi verso un eventuale approfondimento delle ricerche, come è avvenuto per il caso studio di Teixoneres. Senza questa tecnica, probabilmente il frammento umano non sarebbe stato individuato ma sarebbe rimasto tra i resti indeterminati del record faunistico.

Un requisito importante però, per avere uno screening affidabile, è che la preservazione del collagene nei frammenti sottoposti alle analisi sia tale da poter ottenere informazioni tassonomiche dalla maggior parte dei campioni analizzati. Altrimenti, come nel caso studio di Grotta del Cavallo, risulta difficile affermare con certezza l'assenza di un frammento umano all'interno del record osteologico, in quanto moltissimi frammenti sono rimasti indeterminati tassonomicamente. Di conseguenza, il non aver trovato nessun resto di *Homo* non può essere interpretato come un'assenza del taxon all'interno del campione analizzato, ma si può ipotizzare che il pessimo stato di conservazione del collagene ne abbia impedito l'individuazione.

La particolarità dell'approccio utilizzato in questo lavoro è l'integrazione dello studio archeozoologico con quello proteomico: non sono stati analizzati in maniera seriale tutti i campioni indeterminati presenti in un contesto archeologico, ma è stato portato avanti un lavoro di minuziosa osservazione e selezione preliminare dei campioni. Questo metodo ha permesso di evitare campionamenti distruttivi su ogni singolo frammento indeterminato, focalizzandosi soltanto su quelli che rispondevano a determinate caratteristiche e che potenzialmente potevano rivelarsi umani.

È da segnalare però, d'altra parte, che il protocollo seguito per la selezione dei campioni ha comportato una sorta di "sampling bias", limitando le inferenze archeozoologiche che potevano essere avanzate. Evidente soprattutto nel contesto del Riparo del Broion dove, essendosi focalizzati su determinate caratteristiche dei frammenti ossei, sono state selezionate per le analisi proteomiche per lo più ossa che si sono rivelate appartenere a carnivori, perché con caratteristiche più simili alle ossa umane rispetto agli ungulati (maggiore porosità e presenza più estesa di trabecole sulla superficie midollare).

Trattandosi di campioni particolarmente antichi e preziosi, un approccio di tipo conservativo è da preferire, onde evitare di compromettere ulteriormente lo stato di conservazione dei reperti con un campionamento distruttivo. Infatti, nonostante la tecnica ZooMS permetta di ottenere informazioni anche su un quantitativo molto ridotto di osso (circa 30 mg), uno studio di questo tipo potrebbe prevedere una prima fase di analisi non invasiva, tramite l'utilizzo delle tecniche di spettroscopia infrarossa. Questi strumenti infatti permettono di avere delle informazioni qualitative e quantitative sullo stato di preservazione del collagene all'interno del campione, tutelandone e garantendone l'integrità.

La FTIR portatile è già stata applicata a Riparo Bombrini e Arma Veirana, per effettuare un primo screening direttamente sul sito dello stato tafonomico dei campioni che sarebbero poi stati sottoposti ad analisi proteomiche (Pothier Bouchard et al., 2019; Pothier Bouchard et al., 2020). Questa tecnica comporta comunque il campionamento, seppur minimo (circa 1 mg), di polvere del frammento da analizzare. Con il microNIR invece, spettrometro portatile progettato per misurare la riflettanza diffusa nella regione NIR dello spettro elettromagnetico (O'Brien et al., 2012), non risulta necessario campionare il frammento osseo, ma è sufficiente avvicinare lo strumento alla superficie del reperto per ottenere uno spettro che fornisca informazioni sullo stato di conservazione del campione da analizzare.

Avendo intuito le potenzialità di questo strumento, grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Chimica "Giacomo Ciamician" dell'Università di Bologna, è stato effettuato un primo screening sui campioni selezionati per le analisi ZooMS provenienti dal livello musteriano del Riparo del Broion ed è in corso l'analisi del livello uluzziano. Lo scopo è quello di combinare il dato proteomico con quello spettroscopico per avere un quadro ancora più esaustivo del contesto tafonomico dei reperti e tentare di comprendere meglio in che modo i processi diagenetici hanno agito sulla conservazione o degradazione del collagene. I campioni sono stati selezionati in punti diversi del sito, in modo da individuare eventuali differenze in termini di qualità e quantità del collagene, sia dal punto di vista stratigrafico che in termini di areale.

Amelogenina e determinazione del sesso

Il sesso biologico gioca un ruolo importante nell'esperienza umana, correlandola con la durata della vita, la riproduzione, la predisposizione per l'insorgenza di determinate malattie e una serie di altri fattori biologici. Il sesso e il genere sono fondamentali anche per strutturare una serie di comportamenti, compresi i modelli di residenza, parentela, ruoli economici e la costruzione e l'espressione dell'identità. Non sorprende quindi che il sesso sia una delle informazioni più basilari e importanti della bioarcheologia e delle analisi forensi (Buonasera et al., 2020).

In archeologia e paleoantropologia questo dato viene utilizzato per ricostruire la struttura sociale e biologica all'interno dei gruppi presi in esame, rivelando i loro stili di vita, le caratteristiche associate al genere e modellando i processi demografici e di crescita nel passato. Il sesso biologico può essere determinato basandosi su criteri morfologici utilizzando valori e parametri descrittivi. Per quanto riguarda la stima del sesso da resti scheletrici di un individuo adulto, la determinazione ha un tasso di successo superiore al 95%, disponendo di distretti scheletrici diagnostici come bacino o cranio (Acsádi, Nemeskèri, 1970). Ma lo stesso livello di attendibilità non può essere raggiunto quando si stanno analizzando individui particolarmente frammentati o individui prepuberali. Infatti, come è noto, il dimorfismo sessuale non è presente, o meglio, non è abbastanza evidente e marcato nello scheletro umano fino allo sviluppo dei caratteri sessuali secondari, dopo la pubertà (Cardoso, 2008; Loth & Henneberg, 2001). Considerando l'importanza delle informazioni legate al sesso per la ricostruzione del profilo biologico e negli studi paleodemografici, numerosi metodi sono stati proposti con differenti gradi di successo che coinvolgono diverse parti dello scheletro, con una preferenza per i distretti che sono meno esposti al danneggiamento dovuto a eventi tafonomici e/o distretti con considerevole dimorfismo negli adulti (mandibola, bacino e denti) (Cardoso, 2008; Monge Calleja et al., 2020). Sono stati proposti inoltre vari metodi quantitativi che dipendono meno dall'esperienza e dall'errore dell'osservatore (Miller et al., 2019; Wilson et al., 2008, 2017). Nonostante questo, i metodi per la determinazione del sesso sono ancora fortemente imprecisi e parziali. Ad oggi, probabilmente il metodo che permette di ottenere queste informazioni con il grado più alto di confidenza e affidabilità è l'approccio molecolare, tramite l'estrazione del DNA. Però, i costi molto alti e una serie di altre limitazioni, come la forte degradazione e la difficoltà di recuperare il DNA da materiale antico, rendono questo approccio non sempre applicabile e risolutivo, soprattutto quando si tratta di campioni particolarmente compromessi dal punto di vista diagenetico o quando il numero di campioni è consistente (Tierney & Bird,

2015). Per tutti questi motivi, si è reso necessario trovare un'alternativa a questo metodo, che si basasse sempre sull'approccio molecolare ma spostando questa volta il target non più sul "delicato" DNA, bensì sulle proteine. In particolare, quelle intrappolate nello smalto dentale. Buonasera et al., 2020 hanno comparato il metodo proteomico, quello osteologico e quello genetico applicandoli a campioni archeologici, dimostrando che, non solo il metodo proteomico risulta il più sensibile e il più coerente con le analisi osteologiche, ma è anche quello che permette di ottenere risultati su tutti i campioni analizzati, diversamente dal metodo genetico che, in alcuni casi, fornisce dei risultati indeterminati, se il campione risulta particolarmente danneggiato dal punto di vista tafonomico.

Il metodo proteomico, che è stato sviluppato negli ultimi anni, si basa sull'analisi dello smalto dentale attraverso uno spettrometro per cromatografia liquida. Lo smalto è il tessuto che riveste la zona del dente esposta all'ambiente orale (la corona) e protegge i denti dai danni fisici e chimici provenienti dall'esterno. Lo smalto raggiunge il suo massimo spessore in corrispondenza della superficie masticatoria (le cuspidi) mentre si assottiglia in prossimità del colletto. Essendo il tessuto più denso, compatto, resistente e calcificato dell'organismo dei mammiferi, lo smalto può proteggere le sue componenti anche negli ambienti più ostili per un lunghissimo tempo e questo è fondamentale durante il processo diagenetico (Cappellini et al., 2019; Demarchi et al., 2016; Lugli et al., 2019; Welker et al., 2019).

In riferimento alla diagenesi, lo smalto si comporta come un sistema chiuso (Griffin et al., 2009; Dickinson et al., 2019) più impermeabile alle alterazioni derivate dall'ambiente di sepoltura post-mortem (Wang & Cerling, 1994), anche se questo non esclude che ci siano comunque delle alterazioni nella composizione chimica dello smalto legate alla diagenesi (Kohn et al., 1999; Schoeninger et al., 2003) che possono fortemente intaccare la struttura chimica dei denti (Smith et al., 2008). L'amelogenina è una proteina "*intracristallina*" (come è stata definita da Sykes et al., 1995) cioè intrappolata all'interno dei cristalli dello smalto e può essere isolata tramite un trattamento chimico (nello specifico attraverso acido cloridrico). Lo smalto dentale è un sistema chiuso perché la componente minerale può proteggere la frazione biologica (biomolecolare) dalla degradazione: se la materia organica durante il processo diagenetico è protetta dalla componente minerale, la degradazione sarà più lenta. Infatti, dati ottenuti misurando l'estensione dell'idrolisi (uno dei meccanismi che porta alla diagenesi della proteina) in sistemi di biominerali chiusi, mostrano un progressivo rallentamento del tasso di reazione. La presenza di frazioni resistenti all'interno dei legami peptidici potrebbe essere una delle possibili cause.

Queste frazioni potrebbero essere o fortemente idrofobiche o idrofile, ma comunque stabilizzate dalla componente minerale (Demarchi, 2020).

Negli ultimi anni, i passi avanti nella spettrometria di massa per cromatografia liquida (LC-MS/MS), hanno permesso di stimare il sesso dell'individuo tramite l'analisi delle proteine dello smalto dentale, nello specifico dell'amelogenina (Dickinson et al., 2019; Froment et al., 2020; Lugli et al., 2019; Parker et al., 2019; Stewart et al., 2016, 2017; Wasinger et al., 2019), andando anche oltre i limiti correlati all'inaffidabilità dei metodi per la stima del sesso nei non adulti (Rebay-Salisbury et al., 2020; Gowland et al., 2021).

La maturazione dello smalto dentale avviene grazie alla partecipazione di proteine secrete da cellule specializzate chiamate ameloblasti. La maggior parte di queste proteine sono amelogenine strutturalmente eterogenee (AMELX e AMELY), ameloblastina (ABN), enamina (ENAM), metalloproteinasi della matrice (MMP20) e callicreina 4 (KLK4). Le amelogenine sono le principali proteine strutturali della matrice organica dello smalto dentale e rappresentano più del 90% della sua materia proteica. Negli esseri umani, i geni dell'amelogenina sono localizzati sia sul cromosoma X che sul cromosoma Y; le proteine codificate da questi geni sono dimorfiche e quindi rappresentano delle isoforme che hanno delle sequenze amminoacidiche differenti. Il gene di AMELX è espresso nello smalto degli individui di sesso femminile; entrambi i geni (AMELX e AMELY) sono espressi negli individui di sesso maschile. La maturazione dello smalto comporta una massiccia degradazione proteolitica all'interno della matrice organica dello smalto dentale; di conseguenza, lo smalto maturo contiene numerosi frammenti di peptidi delle proteine costituenti (Castiblanco et al., 2015).

Lavori precedenti hanno dimostrato come AMELY possa essere facilmente identificata e discriminata da AMELX all'interno di cromatogrammi ionici ad alta risoluzione delle analisi LC-MS/MS, controllando la presenza del peptide SM(ox)IRPPY (monoisotopico [M+2H] 440.2233 m/z) ed eventualmente altri peptidi correlati ad AMELY (Lugli et al., 2019; Parker et al., 2019). Successivamente, le ricerche nel database MS² (ad es. Uniprot e NCBI) possono essere utilizzate per confermare ulteriormente la classificazione del sesso.

Sulla base di questi studi, sono stati sottoposti all'analisi dello smalto dentale diversi campioni, per comprendere a pieno le potenzialità ma anche i limiti di questa tecnica. I campioni presi in esame sono molto diversi tra di loro per cronologia (dal Mesolitico al XVI-XVIII secolo), per provenienza geografica (Nord e Sud Italia ma anche Brasile) e quindi inevitabilmente anche per il loro differente e caratteristico stato tafonomico, su cui hanno agito fattori diagenetici

propri di ogni singolo contesto. I campioni rispondono a due diversi tipi di problematiche: campioni di non adulti e campioni particolarmente frammentati. Tutti caratterizzati dall'incapacità di determinare con affidabilità il sesso tramite metodi osteologici.

Metodo di analisi dell'amelogenina estratta dallo smalto dentale

Una volta selezionati i denti da sottoporre alle analisi, tramite un trapano da dentista si preleva una piccola quantità di smalto (circa 10 mg) tentando di isolarlo il più possibile dalla dentina. Terminato il campionamento del frammento di smalto, i campioni vengono inizialmente inseriti nel bagno a ultrasuoni con MilliQ, successivamente viene fatta una prima immersione in HCl 5% per soli 5 minuti, come una sorta di pre-lavaggio del campione per poi essere lasciati a demineralizzare per 1 ora con 200 µl di HCl 5% a temperatura ambiente. Dopo la centrifugazione, i campioni contenenti sia minerali che peptidi vengono purificati e concentrati utilizzando delle HyperSep SpinTips (Thermo Scientific) con silica C₁₈. Le SpinTips vengono prima condizionate con 100% acetonitrile e 0.1% di acido formico, poi il campione viene caricato e, dopo una fase di lavaggio della silica, il campione viene eluito con una soluzione di 60% acetonitrile in 0.1% di acido formico. Tutta questa fase delle analisi avviene presso il laboratorio del Dipartimento di Beni Culturali di Ravenna. Successivamente, i campioni vengono lasciati seccare sotto una cappa a flusso laminare per poi essere inviati al Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche dell'Università di Modena e Reggio Emilia dove vengono risospesi con una soluzione di acqua: acetonitrile e acido formico (95:3:2) prima di essere caricati nell'LC-MS/MS. Le analisi vengono eseguite utilizzando un Dionex Ultimate 3000 UHPLC abbinato a uno spettrometro di massa ad alta risoluzione Q Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Viene scelto un tempo di esecuzione pari a 90 minuti per ogni campione. I cromatogrammi sono analizzati utilizzando Xcalibur (Thermo Scientific) con mass tolerance di 5 ppm. Ci siamo focalizzati nello specifico sui peptidi SM(ox)IRPPY (AMELY; [M + 2H]⁺² 440.2233 m/z) e SIRPPYPSY (AMELX; [M + 2H]⁺² 540.2796 m/z) che, in base a studi precedenti, risultano i marcatori sessuali più importanti (Lugli et al., 2019; Stewart et al., 2017). Altri peptidi sono stati ricercati per corroborare la presenza o l'assenza di AMELY. Per identificare altre proteine e peptidi unici AMEL, i dati grezzi sono stati convertiti nel formato generico Mascot e simultaneamente cercati contro Swiss-Prot (limitato a *Homo sapiens*), un nostro database scaricato da UniProt & NCBI e cRAP per i contaminanti. Nessun enzima proteolitico è stato selezionato nei parametri di ricerca. Asparagina e glutammina deamidata (NQ) e metionina ossidata (M) sono state impostate come modificazioni variabili. La mass tolerance è stata impostata a 10 ppm per gli ioni precursori e a 0.05 Da per gli ioni frammentati.

Il tasso di false identificazioni è stato stimato tramite un database automatico con una soglia di probabilità ridotta a un FDR 1%. Una specifica proteina veniva considerata come identificata se venivano osservati almeno due peptidi significativi.

Applicazioni amelogenina:

Stima del sesso nei non adulti

1. Necropoli di Valdarò (MN)

1.1 Il sito

I campioni analizzati provengono da una necropoli collocata nella zona della Lombardia Sud-orientale durante le invasioni longobarde del VII-VIII secolo d.C. Le fonti storiche relative alla necropoli di Valdarò, piccolo agglomerato urbano alle porte di Mantova, non sono molte. La campagna archeologica è stata condotta negli anni 2008-2009 dalla Soprintendenza per i Beni Archeologici della Lombardia. Si tratta di una necropoli di età altomedievale (VII-VIII secolo d.C.), inizialmente ritenuta sito di inumazione longobarda ma successivamente definita sito di inumazione utilizzato dalla popolazione locale per la tumulazione dei propri defunti (Orlandi, 2013). L'orientamento della necropoli, che segue quello dell'abitato, ha direzione Est-Ovest. Gli inumati sono deposti prevalentemente in fosse terragne di forma rettangolare e raramente, in casi di sepolture plurime, in casse laterizie o in tombe alla cappuccina, più facili da aprire in caso di inumazioni successive. I defunti sono disposti in posizione supina, con arti inferiori stesi, braccia stese lungo il corpo, mani rivolte verso il bacino e capo rivolto ad Ovest e ruotato indifferentemente a Sud o a Nord (Orlandi, 2013). La disposizione delle tombe si caratterizza per l'organizzazione in piccoli gruppi, probabilmente riconducibili a nuclei familiari, ma non mancano le sepolture isolate. Gli individui che compongono la necropoli sono circa un centinaio, prevalentemente sepolture singole di soggetti adulti o non adulti, con alcuni casi di sepolture bisome (T.6, T.24, T.70, T.71, T.87, T.95), triple (T.11, T.35) e plurime (T.33, T.34, T.36, T.44, T.89). Gli individui presi in esame in questo studio sono stati collocati nella categoria dei non adulti, appartenenti, dunque, alla fascia di età che va dalla nascita ai diciannove anni. All'interno del cimitero altomedievale di Valdarò sono stati rinvenuti 40 scheletri di non adulti. Nel complesso, lo stato di conservazione e la rappresentazione dei distretti anatomici era scarsa. Nella maggior parte dei casi, l'osso corticale non era ben conservato, e gli elementi scheletrici erano spesso frammenti o addirittura assenti. Un

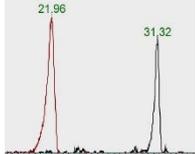
sottoinsieme di non adulti meglio conservati (n = 30) è stato studiato presso il Laboratorio di Osteoarcheologia e Paleoantropologia - Bones Lab del Dipartimento di Beni Culturali di Ravenna (Costa, 2018).

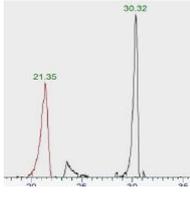
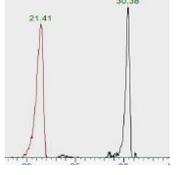
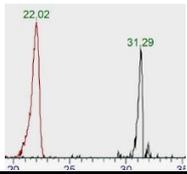
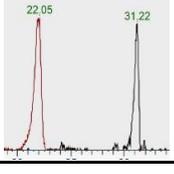
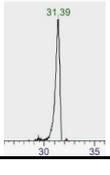
1.2 Materiali

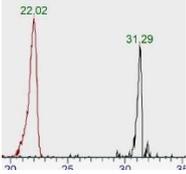
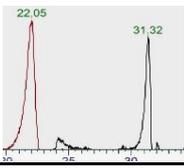
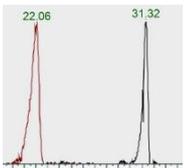
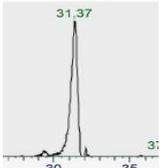
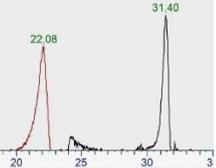
Sono stati selezionati, in base al loro stato di conservazione, 30 individui non adulti. Si è proceduto poi al campionamento di 26 frammenti di smalto dentale (circa 10 mg) con l'ausilio di un trapano da dentista, tentando di isolare il più possibile lo smalto dalla dentina (Lugli et al., 2019). Per 4 gemme dentali (T.37, T.61, T.65 e T.79) invece, proprio perché la tipologia di dente impediva di isolare lo smalto dalla dentina, i campioni sono stati immersi interamente nell'acido, questo protocollo è stato utilizzato soltanto per gli individui con scarsa mineralizzazione dentaria (Stewart et al., 2017).

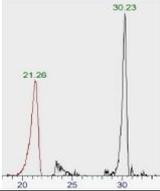
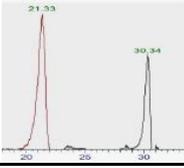
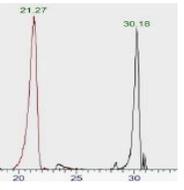
1.3 Risultati

Dopo aver ispezionato i cromatogrammi, il peptide di AMELX SIRPPPYSY è stato riscontrato in tutti i campioni analizzati, mentre il peptide di AMELY SM(ox)IRPPY in 13 campioni su 30 (tabella 24). Le ricerche in Mascot hanno evidenziato la presenza anche di altre proteine come enamelina e ameloblastina. Anche COL1A1 (collagene di tipo 1 α 1), COL1A2 (collagene di tipo 1 α 2) e DSPP (sialoproteina dentina) sono state individuate, probabilmente legate a residui di dentina nel frammento di smalto. Non sono stati riscontrati contaminanti moderni. Entrambi i protocolli utilizzati hanno permesso di ottenere informazioni legate al sesso degli individui, anche per gli infanti con un grado molto ridotto di mineralizzazione dentaria.

Tomba (Individuo)	Dente campionato	Determinazione	Cromatogramma
T.38	Ldi ¹	F	
T.85	Rdm ¹	M	

T.70 (Individuo 2)	Ldm ¹	F	
T.16	Rdm ₁	M	
T.48	Rdi ²	M	
T.37	Ri ₂	F	
T.46	Rdm ₂	F	
T.59	Rdm ¹	M	
T.65	Rdc	M	
T.70 (Individuo 1)	Rdm ¹	F	
T.55	Ldc	F	

T.79 (Individuo 1)	Rdc	M	
T.75 (Individuo 1)	Ldm ¹	F	
T.53	Rdm ²	F	
T.72	Rdm ₁	M	
T.82	Rdm ²	F	
T.124	Ldm ¹	M	
T.43	Ldm ¹	F	
T.64	Rdc	F	
T.54	Rdm ¹	M	

T.61 (Individuo 1)	RM ¹	F	
T.42 (Individuo 1)	Rdm ¹	M	
T.71 (Individuo 1)	Ldc	F	
T.76	Rdc	F	
T.29	Ri ₂	M	
T.123	Ri ₁	F	
T.20 (Individuo 1)	Li ²	F	
T.52	LM ₂	F	
T.21 (Individuo 1)	Lp ³	M	

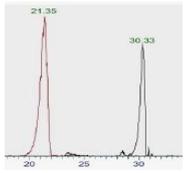
T.22	Lm ³	M	
------	-----------------	---	---

Tabella 24. Risultati analisi amelogenina con determinazione del sesso

2. Arma Veirana

2.1 Il sito

La grotta di Arma Veirana si trova nelle prealpi liguri (circa 15 km a Nord-Ovest della città di Albenga). Si trova sul lato Nord della ripida Val Neva, all'interno di una scogliera di marmo ad un'altitudine di 451 m s.l.m. La grotta, orientata in senso Sud-Ovest, misura 11 m di larghezza e 44 m di lunghezza. I soffitti a volta formano una V rovesciata che raggiunge un'altezza massima di circa 10 m dal pavimento moderno, che si inclina verso il basso nella parte posteriore della grotta. Gli scavi hanno rivelato ricchi depositi del Paleolitico medio. All'interno di questo contesto sono stati identificati dei resti scheletrici riconoscibili come *Homo* sulla base della valutazione osteologica tradizionale. Tuttavia, quando la fossa funeraria è stata identificata per la prima volta nel 2017, c'era qualche dubbio sulla disposizione delle ossa e se ci fossero più resti umani. Un frammento di cranio è stato campionato quindi per le analisi ZooMS e il collagene risultante conteneva tutti i marcatori peptidici umani noti in letteratura. I resti ossei rinvenuti appartengono a un neonato, le cui ossa sono state datate a 10,280-9,924 anni cal BP quindi attribuibili al primo Mesolitico. I ricchi ornamenti che sono stati rinvenuti in associazione alla sepoltura di questo infante indicano un investimento materiale e un coinvolgimento emotivo nei confronti del bambino/a. I resti risultano gravemente danneggiati a causa del calpestio superficiale, dell'erosione dell'acqua e di agenti chimici che hanno agito sulle ossa. Probabilmente, la bassa profondità della fossa funeraria rispetto al pavimento moderno della grotta ha portato alla compressione e frammentazione di gran parte dello scheletro, che risulta mancante in diversi distretti. Le analisi eseguite sui denti e in particolare la valutazione istologica virtuale dello sviluppo dello smalto fornisce una stima molto precisa dell'età alla morte dell'individuo: 40-50 giorni dalla nascita. Su questo individuo è stata eseguita l'analisi dell'amelogenina per la stima del sesso.

2.2 Materiali

Le analisi proteomiche tramite LC-MS/MS sono state eseguite su un piccolo frammento di dente (circa 10 mg tra dentina e smalto) del primo molare sinistro mascellare per stimare il sesso del campione. Prima di campionare, è stata effettuata una microCT del dente.

2.3 Risultati

Sia il cromatogramma che le ricerche Mascot hanno identificato la presenza di AMELX all'interno dello smalto dentale del campione, al contrario, nessun peptide unico AMELY è stato trovato. Ciò suggerisce che il campione era probabilmente un individuo femminile. La falsa identificazione positiva di un individuo femminile è rara ma possibile, ad esempio nel caso di carenze parziali della sequenza amminoacidica. Altre proteine relative ai denti sono state identificate come l'ameloblastina e il collagene di tipo I, quest'ultimo probabilmente legato alla presenza di dentina all'interno del campione di smalto analizzato. Inoltre, la ricerca Mascot ha rilevato la presenza della fetuina_A, una proteina molto abbondante nel plasma fetale, in linea con il fatto che si tratta appunto di un individuo di circa 40 giorni. Nessun contaminante moderno è stato individuato tramite il database cRAP (figura 27).

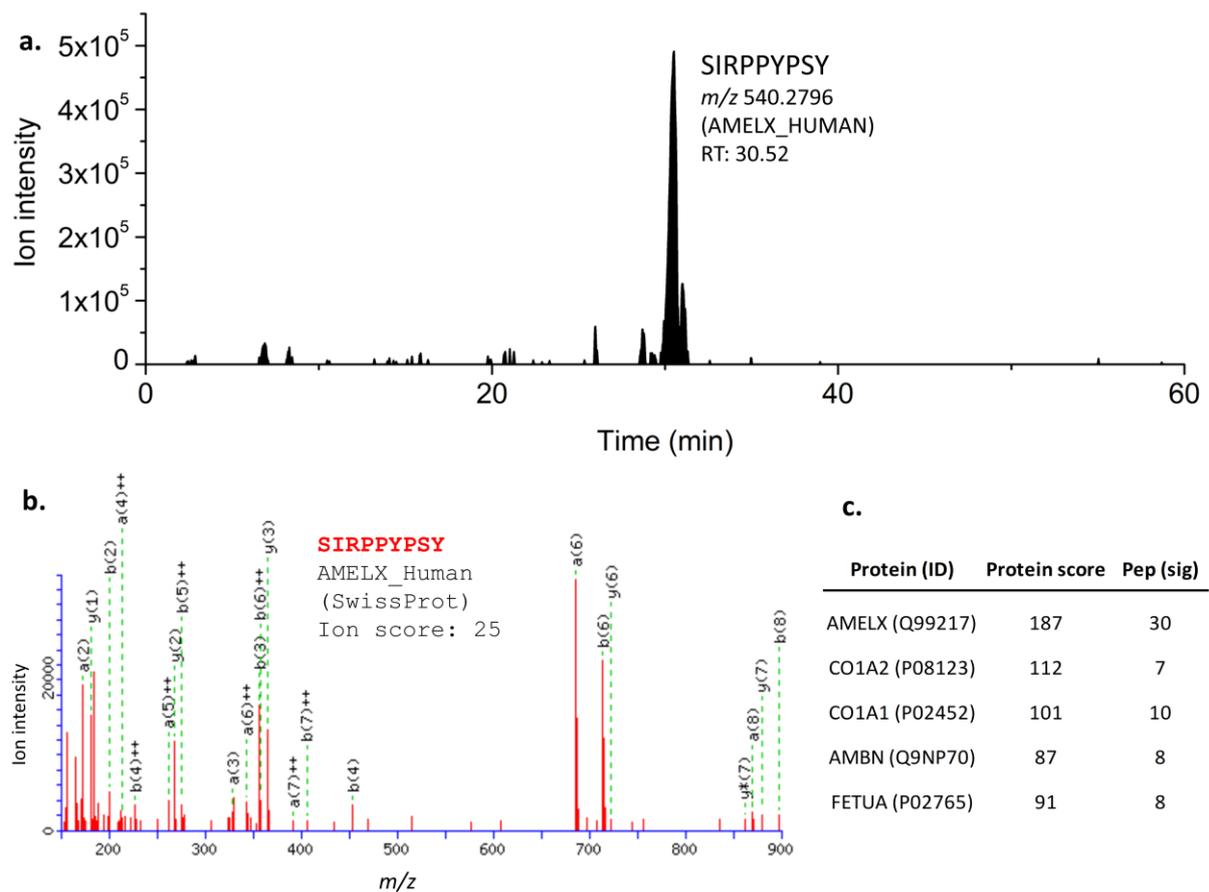


Figura 27. Cromatogramma del campione con elenco delle proteine identificate con la ricerca in database

3. Lazzaretto Vecchio di Venezia

3.1 Il sito

La peste arrivò a Venezia e in Europa nel 1348 dalla Dalmazia attraverso le imbarcazioni mercantili, trasportata da marinai contagiati fuggiti da Caffa, dove era iniziata la pandemia. Il Maggior Consiglio, principale organo di governo della città di Venezia, decise di fronteggiare l'emergenza nominando tre savi che si preoccuparono innanzitutto della sepoltura dei morti: i corpi di poveri e mendicanti furono portati su varie isole dell'arcipelago, mentre i cittadini vennero seppelliti nei campisanti in città sotto grandi quantità di terra (Mueller, 1980). Dopo un susseguirsi di successivi focolai annuali, la seconda ondata pestilenziale a Venezia si presentò nel 1423. Come manovra sanitaria la Signoria e il Collegio di Venezia, sulla scia della città di Ragusa, assunsero l'autorità di proibire ai viaggiatori provenienti da zone infette dalla peste l'accesso a Venezia e decisero la costruzione del primo istituto permanente per la cura degli appestati e per la sepoltura dei morti, ovvero il Lazzaretto Vecchio (Tran et al., 2011). Situato sull'isola del monastero di Santa Maria di Nazareth, era amministrato dai Savi alla Sanità, che nel 1485 divennero magistratura ordinaria e stabile, prendendo il nome di Provveditori alla Sanità (Palmer, 1980). La fama del modello veneziano fu tale che dalla storpiatura del nome dell'isola, *Nazzaretto*, nacque il termine iconico "*lazzaretto*" (Mueller, 1980) e nei secoli successivi, sia in Italia sia in Europa, si andò diffondendo la pratica di istituire lazzeretti marittimi e/o terrestri, al fine di non congelare i movimenti commerciali e permettere così il libero movimento di uomini e merci, a seguito del rilascio di salvacondotti di circolazione (Cliff, 2009). Lo scavo archeologico svoltosi sull'isola tra il 2004 ed il 2006 ha portato in luce, insieme a numerosi reperti archeologici, circa 2000 scheletri umani depositi all'interno di molteplici tombe e fosse comuni. Una selezione di questi scheletri è stata portata presso il Bones Lab del Dipartimento di Beni Culturali di Ravenna.

3.2 Materiali

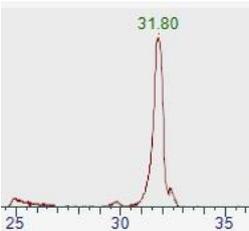
Le analisi proteomiche tramite LC-MS/MS sono state eseguite su 38 individui di cui l'analisi osteologica non ha potuto determinare il sesso; di questi è stato campionato un piccolo frammento di smalto. In generale, si è tentato di selezionare sempre molari, ma ove questi non erano disponibili, sono stati scelti altri denti. Per la selezione sono stati preferiti quei denti che presentavano delle lievi tracce tafonomiche e una migliore conservazione in termini diagenetici.

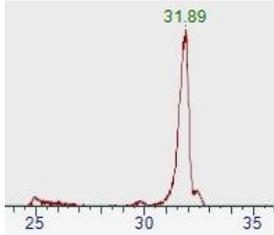
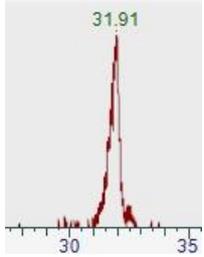
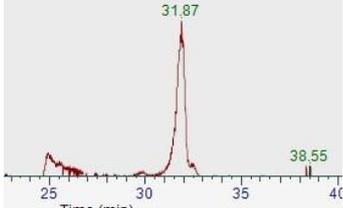
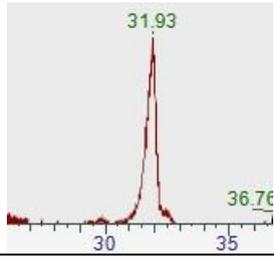
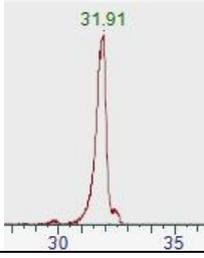
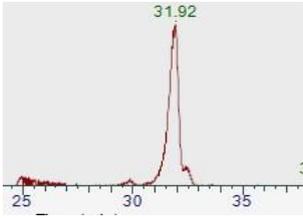
3.3 Risultati

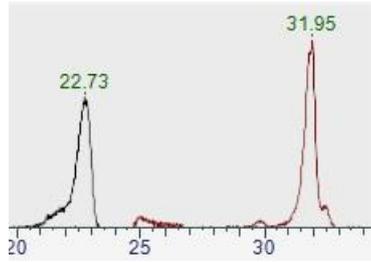
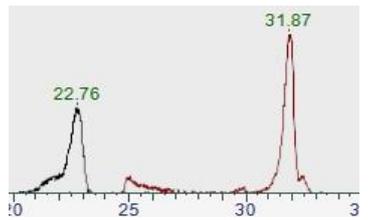
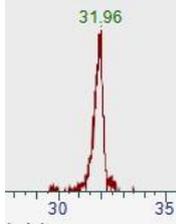
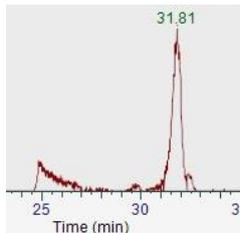
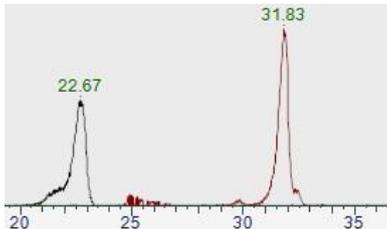
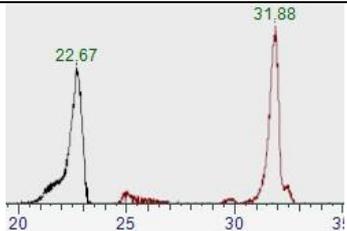
Dei 38 campioni analizzati per la stima del sesso, tutti hanno fornito un risultato. 19 campioni sono stati classificati come maschi, 19 femmine (tabella 25). In generale, i picchi all'interno del cromatogramma non sono particolarmente intensi e definiti, questo potrebbe essere dovuto alla condizione tafonomica del campione; infatti alcuni denti si presentavano di colore nero come per la presenza di un fungo o una muffa (Fernández-Jalvo & Andrews, 2016). Questo elemento può essere spiegato dal fatto che si tratta di campioni che sono stati a contatto con l'acqua del mare che ha influito inevitabilmente sulla preservazione del campione e sulla buona riuscita delle analisi.

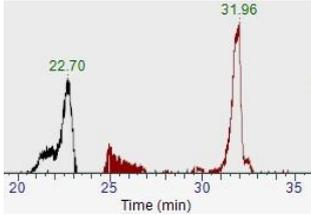
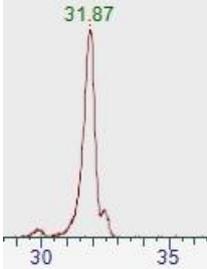
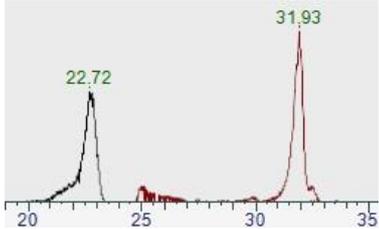
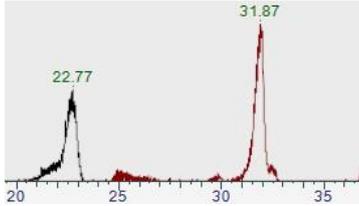
Una differenza rispetto agli altri campioni analizzati provenienti da altri contesti, è l'utilizzo per la fase di purificazione e concentrazione delle stage tips assemblate nel Bones Lab, mentre per tutti gli altri sono state utilizzate le SpinTips (Thermo Scientific). Si può supporre che possa esserci stato un errore nella fase di posizionamento dei dischi in silice all'interno dei puntali e che quindi la fase di condizionamento della silice non sia avvenuta in maniera omogenea su tutta la superficie del dischetto; questo può aver compromesso, almeno in parte, la fase di eluizione dei campioni. Anche se la qualità degli spettri non risulta altissima, è stato comunque possibile ottenere la stima del sesso per tutti i campioni analizzati (tabella 25).

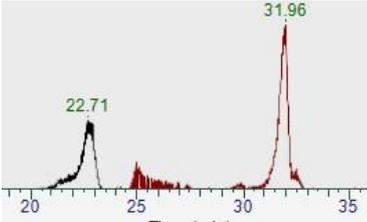
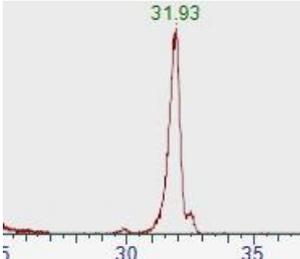
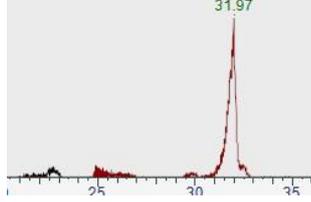
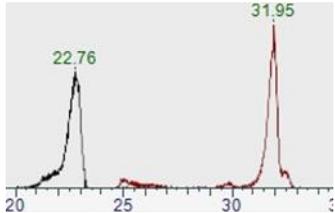
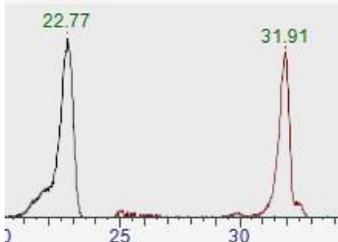
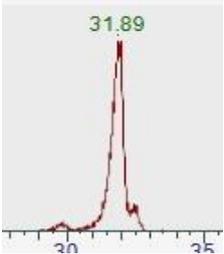
I campioni sono stati scelti per questo tipo di analisi perché tramite osservazione osteologica non è stato possibile ottenere la determinazione del sesso. Sono stati analizzati infatti campioni che presentavano due diversi tipi di problematiche: campioni di non adulti e campioni che non conservavano i distretti scheletrici diagnostici per la stima del sesso, perché troppo frammentati. In questo caso, l'analisi dell'amelogenina ha permesso di superare i limiti legati a queste due diverse problematiche, supportando le tecniche tradizionali e fornendo delle informazioni che altrimenti non sarebbe stato possibile ottenere.

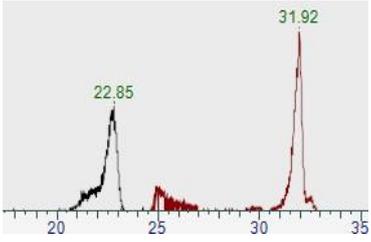
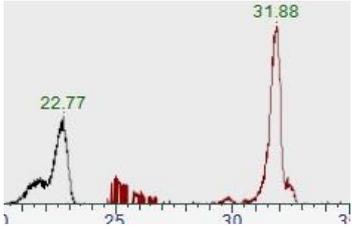
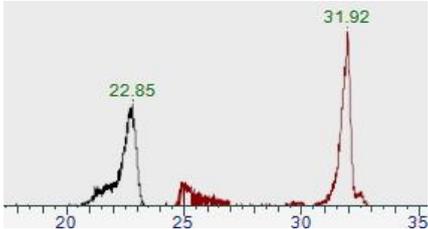
Fossa	Ind.	Campione	Codice	Sesso	Età	Spettro
FC 17	Ind. 4	gLM ¹	LV_17_4	F	9-10.5 y	

FC 17	Ind. 6	Ldm ²	LV_17_6	F	5-6 y	
FC 18A	Ind. 9	Rdm ²	LV_18A_9	F	3,5-4,5 y	
FC 18A	Ind. 13	Rdm ₂	LV_18A_13	F	ca 5-5,5 y	
FC 18A	Ind. 14	Rdm ²	LV_18A_14	F	2,5-4 y	
FC 18A	Ind. 15	gRI ¹	LV_18A_15	M	9,5-10,5 y	
FC 18A	Ind. 16	RM ₁	LV_18A_16	F	14,5-15,5 y	

FC 18A	Ind. 17	gRI ¹	LV_18A_17	M	11,5-12,5 y	
FC 18A	Ind. 18	RM ₁	LV_18A_18	M	10,5 -11,5 y	
FC 19	Ind. 1	gRI ¹	LV_19_1	M	ca 6,5 y	
FC 19	Ind. 3	gRdm ₁	LV_19_3	F	12-24 m	
FC 19	Ind. 4	gRdm ¹	LV_19_4	F	3,5-4,5 y	
FC 19	Ind. 7	RM ¹	LV_19_7	M	14,5-16,5 y	
FC 19	Ind. 10	gRM ¹	LV_19_10	M	ca 7,5 y	

FC 19	Ind. 12	gRdm ₁	LV_19_12	M	10 - 12 m	
FC 19	Ind. 14	RM ₁	LV_19_14	F	20-29 y	
FC 19	Ind. 19	gRM ¹	LV_19_19	F	8,5-9,5 y	
FC 64B	Ind. 2	gRM ₁	LV_64B_2	M	10-11 y	
FC 64B	Ind. 3	gRI ₁	LV_64B_3	M	6,5 y	
FC 64B	Ind. 7	Ldm ¹	LV_64B_7	M	ca 1,5 - 2 y	

FC 64B	Ind. 10	RM ¹	LV_64B_10	M	9-10 y	
FC 64B	Ind. 11	LM ¹	LV_64B_11	F	ca 8,5 y	
FC 64C	Ind. 3	Ldm ₂	LV_64C_3	F	ca. 4,5 y	
FC 64C	Ind. 4	LI ¹	LV_64C_4	F	ca.12 y	
FC 64C	Ind. 5	LM ²	LV_64C_5	M	15-16 y	
FC 64C	Ind. 6	Rc	LV_64C_6	F	ca 12,5 y	

FC 64C	Ind. 7	gRM ¹	LV_64C_7	F	ca 6,5 y	
FC 65B	Ind. 1	gLM ¹	LV_65B_1	M	6,5 - 7,5 y	
FC 65B	Ind. 9	Rdm ¹	LV_65B_9	M	ca 6,5 y	
FC 65B	Ind. 10	RI ²	LV_65B_10	F	>30 y	
FC 65B	Ind. 13	RM ₂	LV_65B_13	F	12-15 y	
FC 97	Ind. 1	RI ¹	LV_97_1	F	ca 7,5 y	

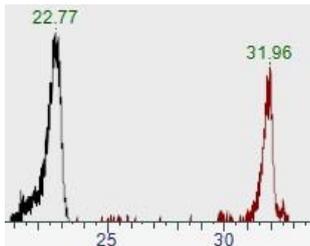
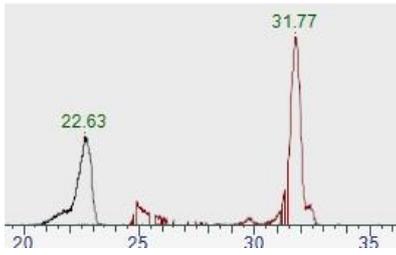
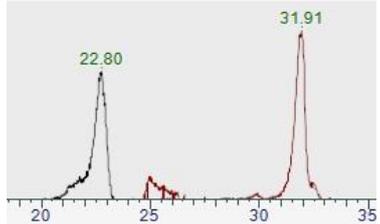
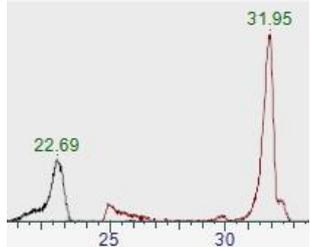
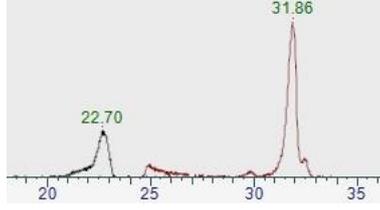
FC 97	Ind. 9	LI ₂	LV_97_9	M	ca. 11,5 y	
FC 97	Ind. 12	LI ₂	LV_97_12	M	13,5 - 14,5 y	
FC 97	Ind. 17	LM ₁	LV_97_17	M	ca. 14,5 y	
FC 97	Ind. 18	LM ₁	LV_97_18	M	ca. 14,5 y	
FC 97	Ind. 19	LM ¹	LV_97_19	F	ca. 9-10 y	
FC 97	Ind. 21	L _C	LV_97_21	M	16-17 y	

Tabella 25. Risultati analisi amelogenina con determinazione del sesso

Stima del sesso in individui da frammenti indeterminabili

1. Necropoli di Vicenne e Morrione di Campochiaro (CB)

1.1 Il sito

Le due necropoli medievali (VII sec. CE) (Vicenne e Morrione) di Campochiaro, scoperte negli anni '80 e '90 del secolo precedente sono situate a circa 1 km l'una dall'altra e fanno parte dello stesso contesto culturale. Sono state individuate 397 sepolture, i cui corredi funerari mostrano una combinazione di elementi stilistici barbaro-tedeschi, romano-bizantini e tipici dei popoli nomadi delle steppe (Ceglia e Genito, 1991). Le armi sono un elemento comune nelle sepolture maschili, mentre i gioielli sono il ritrovamento più comune nelle sepolture femminili (Bona, 2000; Ceglia, 2004; Ceglia, 2010; De Vingo, 2017; Fedele et al., 2019). Altri corredi funerari comuni includono ceramiche, a volte monete, vasi di vetro e ossa di animali (Ceglia, 2010; Ceglia e Marchetta, 2012). Il sito è stato assegnato al VII secolo utilizzando metodi di datazione relativa, tra cui l'organizzazione delle sepolture, l'analisi numismatica e lo studio della tipologia delle armi (Arslan, 2004; Ceglia, 2010; Ceglia & Marchetta, 2012). Le sepolture sono organizzate in file parallele con un orientamento Ovest-Est ulteriormente raggruppate in modo "nucleare", con sepolture più elaborate circondate da individui senza rituale di sepoltura che a volte indicano legami familiari (De Vingo, 2017). L'aspetto più singolare di queste necropoli è la presenza di diciannove sepolture di cavalieri con cavalli (Ceglia, 2004; Ceglia, 2010; Ceglia & Marchetta, 2012; Ebanista, 2011; De Vingo, 2017), dodici e sette di questi sono stati trovati in una posizione centrale a Vicenne e Morrione. L'individuo veniva sepolto sia in terra nuda che in fosse rivestite con pietre o supporti di legno insieme all'intero cavallo, corredi funebri, armi, staffe e spesso con elementi che fanno pensare a una "festa funeraria" rappresentata da recipienti per bere e ossa di animali domestici (Ceglia, 2010; De Vingo 2017)

Negli ultimi 20 anni sono state effettuate numerose analisi antropologiche per ricostruire le caratteristiche biologiche e lo stile di vita di questa popolazione (Belcastro, 2001; Belcastro & Facchini, 2001, 2004; Belcastro et al., 2001, 2002, 2003, 2007; Tanganelli et al., 2014). Ma, essendoci ancora dei dubbi sulla determinazione del sesso, 15 individui sono stati campionati per essere sottoposti all'analisi dell'amelogenina: 9 da Vicenne e 6 da Morrione. 9 di loro erano archeologicamente classificati come cavalieri (Vicenne: tt. 73, 79, 81, 109/110, 150, 155; Morrione: tt. 70, 134, 152). Tra i cavalieri vicenni, solo l'individuo di t. 109/110 poteva essere assegnato come maschio in base alle caratteristiche scheletriche, mentre gli altri (tt. 73, 79, 81, 155) erano probabilmente maschi. Sono stati analizzati inoltre 2 individui non adulti di Vicenne

(tt. 12, 15). Quest'ultimo (tt.15) era stato determinato come femmina sulla base del corredo funerario.

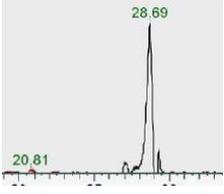
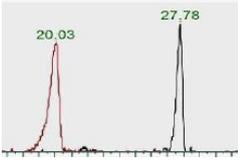
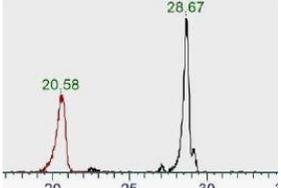
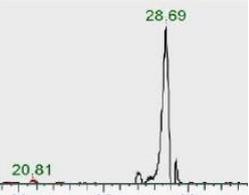
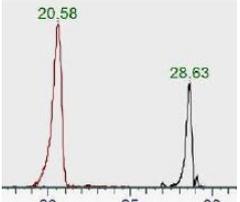
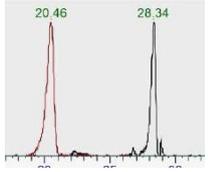
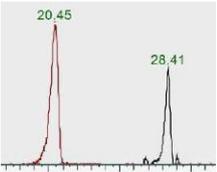
1.2 Materiali

Sono stati sottoposti ad analisi frammenti di smalto dentale appartenenti a 15 individui. I campioni sono stati selezionati in base al loro stato di conservazione, con una preferenza per il primo molare permanente superiore, in modo da utilizzare lo stesso frammento anche per le analisi isotopiche. Quando non disponibile, è stato selezionato il primo molare inferiore. Se anche questo era assente, sono stati selezionati premolari superiori o inferiori.

1.3 Risultati

La stima del sesso è stata possibile per tutti i campioni presi in esame. 12 campioni su 15 presentano i peptidi specifici legati ad AMELY, di conseguenza possono essere considerati maschi. Soltanto 3 individui sono stati identificati come possibili femmine, perché non sono stati individuati peptidi legati ad AMELY. Sono state poi individuate altre proteine grazie alla ricerca in database: è stata osservata la presenza di ameloblastina (in tutti i campioni), enamulina (5 campioni) e collagene di tipo I $\alpha 2$ in 3 campioni. Quest'ultimo probabilmente dovuto a qualche residuo di dentina non del tutto rimossa durante la fase di campionamento del frammento di smalto.

L'analisi dell'amelogenina ha permesso di attribuire il sesso a 15 individui indeterminati dal punto di vista dell'osservazione morfologica dei distretti scheletrici diagnostici e ha anche permesso di confermare le ipotesi sulla stima del sesso che erano state avanzate con i metodi osteologici (tabella 26).

Sito	Tomba	Id.lab	Foto del campione	Determinazione osteologica	Determinazione amelogenina	Cromatogramma
Vicenne	12	cc12		IND	F	
Vicenne	15	cc15		IND	M	
Vicenne	150	cc150		IND	M	
Vicenne	40	cc40		F?	F	
Vicenne	73	cc73		M?	M	
Vicenne	79	cc79		M?	M	
Vicenne	81	cc81		M?	M	

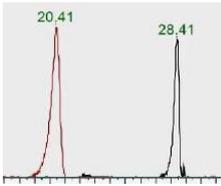
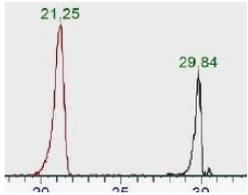
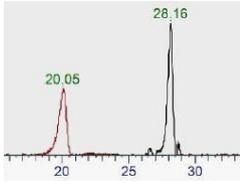
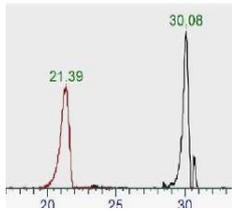
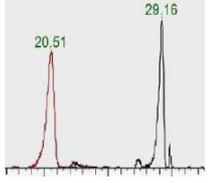
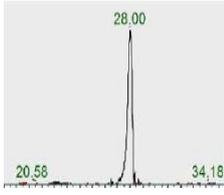
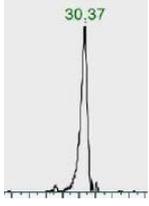
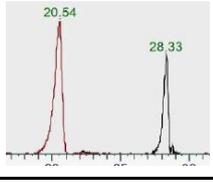
Vicenne	155	cc155		M?	M	
Vicenne	109/110	cc109/110		M?	M	
Morrione	134	cc134		IND	M	
Morrione	152	cc152		IND	M	
Morrione	171	cc171		IND	M	
Morrione	68	cc68		F	F	
Morrione	135	cc135		F	F	
Morrione	70	cc70		M?	M	

Tabella 26. Risultati analisi amelogeina con determinazione del sesso

2. Foz do Chapecó

2.1 Il sito

L'area archeologica si trova nella zona meridionale del Brasile, nel comune di Águas de Chapecó, sul fiume Uruguay. Su richiesta del governo di Rio Grande do Sul, è stata organizzata una prima campagna archeologica dal 1875 al 1887 durante la quale sono state rinvenute le prime evidenze archeologiche. In particolare, furono ritrovati e registrati utensili e sepolture risalenti alla tradizione Tupi-guaraní (Bonomo et al., 2015).

In seguito a un'indagine archeologica avvenuta nel 2004, vennero registrati 12 siti archeologici tutti ai margini del fiume (ACH-SU-01, ACH-SU-02, ACH-SU-03, ACH-LP-01, ACH-LP-02, ACH-LP-03, ACH-LP-04, ACH-LP-05, ACH-LP-06, ALP-AA-01, ALP-AA-02, ALP-AA-03). Durante un'ulteriore campagna di scavo nel 2006, nel sito ACH-SU-03 sono state rinvenute 6 strutture funerarie, datate tra il 540 e il 490 anni fa cal BP (Caldarelli, 2010).

In generale, tutte le strutture funerarie del sito ACH-SU-03 presentano un pessimo stato di conservazione, tanto che alcune strutture sono state divise in blocchi per poi essere scavate in laboratorio. All'interno di queste strutture sono stati ritrovati per lo più denti sparsi e recipienti di ceramica, a volte frammenti di ossa e ornamenti.

Il sito ACH-LP-07 si trova sul margine destro del fiume Uruguay a un'altitudine tra 225 e 237 m e si estende su un'area lunga 400 m e larga 50 m. Nel settore 2 di questo sito, che copre un'area di 12 m² è stata ritrovata un'urna funeraria di tradizione Tupi-guaraní nell'unità stratigrafica del livello 1, sulla quale non è stato possibile ottenere datazioni attendibili. La sepoltura rinvenuta si presentava abbastanza completa, ma durante lo scavo molte ossa si sono disgregate, per questo motivo il blocco contenente il cranio e la mandibola, rinvenuto vicino alle ossa del cinto pelvico, non è stato scavato, ma è stata effettuata una tomografia computerizzata (CT) per poter valutare il contenuto dell'urna e cercare di comprendere in che posizione fosse stato deposto il defunto all'interno dell'urna.

Secondo Lourdeau (2016), nel sito ACH-LP-07 (settore 1 e 2) sono stati identificati 4 diversi momenti di occupazione pre-coloniale. La prima occupazione della zona è stata datata alla transizione Pleistocene-Olocene (Settore 1, tra 11,400 e 11,150 anni fa cal BP); la seconda è avvenuta durante l'inizio dell'Olocene antico (tra il 10,700 e 9,500 anni fa cal BP); la terza durante la fine dell'Olocene antico (livello 1 del settore 2, risalente a circa 8,000 anni fa cal BP)

e l'ultima occupazione è avvenuta nell'Olocene recente (urna del settore 2, datata a circa 400 anni fa cal BP) (Lourdeau et al., 2016).

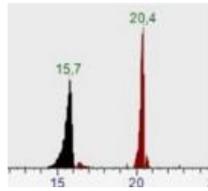
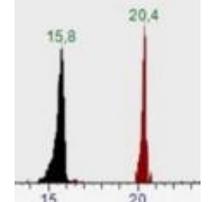
Infine, il sito archeologico RS-URG-01 si trova sul margine sinistro del fiume Uruguay, nel comune di Alpestre nello stato di Rio Grande do Sul, ad un'altitudine tra i 223 e 228 m. Il sito è stato diviso in quattro settori: nel settore 2 è stata rinvenuta una delle otto strutture funerarie Guarani. Questa sepoltura non è stata ancora studiata, eccetto per l'analisi dell'amelogenina svolta su uno dei denti dell'individuo (Ruggeri, 2020).

2.2 Materiali

I denti analizzati per la stima del sesso tramite amelogenina appartengono a 8 individui che provengono dal sito ACH-SU3-C2 dalle strutture funerarie 3, 4, 5 e 6 (5 denti), dal sito ACH-LP-07-S2 e un altro dal sito RS-URG-01, di cui è stato analizzato un piccolo frammento di smalto (circa 10 mg).

2.3 Risultati

Nonostante i campioni fossero particolarmente delicati e fragili perché in pessimo stato di conservazione, è stato possibile stimare il sesso di tutti gli individui analizzati: 4 sono stati riconosciuti come maschi e 3 femmine. Per gli individui di sesso maschile sono presenti due picchi all'interno del cromatogramma (uno per AMELX e uno per AMELY) mentre per quelli femminili soltanto il picco in corrispondenza del peptide SIRPPYPSY (tabella 27).

Individuo	ID.Lab.	Determinazione	Classe dentale	Foto	Cromatogramma
ACH-SU3-C2 struttura funeraria 3, blocco 1	POP 5	M	LM ₁		
ACH-SU3-C2 struttura funeraria 3, blocco 2	POP6	M	RM ₁		

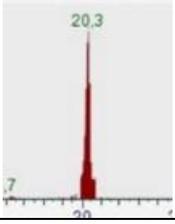
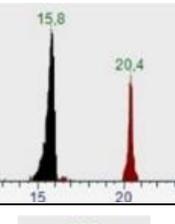
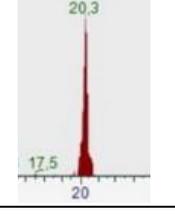
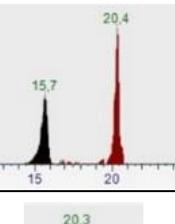
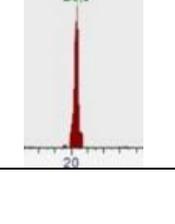
ACH-SU3-C2 struttura funeraria 3, blocco 3	POP2	F	M _{1/2}		
ACH-SU3-C2 struttura funeraria 4	POP7	M	M ¹		
ACH-SU3-C2 struttura funeraria 5	POP1	F	RM ₁		
ACH-LP-07-S2/2014	POP8	M	LM1		
RS-URG-01-S2/2015	POP4	F	RM ₁		

Tabella 27. Risultati analisi amelogenina con determinazione del sesso

Conclusioni

La stima del sesso dallo scheletro è fondamentale per lo studio delle popolazioni passate e per stabilire l'identità in contesti forensi. I metodi tradizionali di stima macroscopica del sesso in bioarcheologia si basano sulla presenza e l'analisi di elementi scheletrici sessualmente dimorfici, come le ossa del bacino e il cranio. Trattandosi di contesti archeologici, la probabilità di perdere questo dato è molto alta, perché legata allo stato di conservazione e quindi frammentazione dei vari distretti scheletrici dell'individuo. Nei non adulti, la maggior parte dei metodi che sono stati sviluppati hanno un grado di affidabilità molto scarso, almeno prima della pubertà. L'incapacità di determinare in modo affidabile il sesso dei non adulti ha posto non

pochi limiti agli studi su di essi e ha contribuito alla loro emarginazione all'interno degli studi e delle ricerche archeologiche (Lewis, 2007).

L'analisi del DNA antico fornisce potenzialmente una soluzione, ma, essendo una molecola molto "delicata", non sempre si preserva nei contesti archeologici presi in esame e rimane comunque una tecnica molto costosa e distruttiva. Le proteine possono essere una valida alternativa per le analisi di questo tipo in diversi contesti archeologici, perché la loro struttura molecolare è più favorevole alla conservazione nel corso del tempo rispetto al DNA (Poinar & Stankiewicz, 1999; Wadsworth & Buckley, 2014). Inoltre, poiché i peptidi dell'amelogenina sono incorporati nella componente minerale dello smalto dentale, il materiale più resistente e durevole nel corpo umano, tali peptidi possono essere particolarmente stabili e persistenti per periodi di tempo molto lunghi (Welker et al, 2019; Demarchi et al., 2016). Tutto ciò permette allo studio delle proteine di essere un metodo molto affidabile e di possedere una serie di vantaggi nei confronti del metodo genetico, che è sempre legato alla variabile dell'ambiente di sepoltura dal quale proviene il campione. Soprattutto, questo approccio subisce una drastica riduzione del suo tasso di successo quando viene applicato in contesti collocati in zone tropicali e umide, diversamente dalle analisi proteomiche che sono state applicate con successo anche in contesti con climi particolarmente caldi (Wasinger et al., 2019).

L'applicazione della paleoproteomica nei vari contesti presi in esame si è rivelata utile ai fini dell'ottenimento della stima del sesso, fornendo risposte a domande che erano rimaste irrisolte.

Nel caso della necropoli di Valdarò, entrambi i protocolli sperimentati, l'analisi dell'amelogenina tramite estrazione da frammento di smalto dentale e l'analisi tramite immersione dell'intera corona, nel caso delle gemme, hanno permesso di determinare il sesso di tutti i campioni, dimostrando la loro efficacia e la possibilità di ottenere questo dato anche di fronte a campioni con ridotto grado di mineralizzazione dentaria.

Per Arma Veirana, il contesto più antico preso in esame (10,280-9,924 anni fa cal BP), è stato possibile individuare il primo caso di sepoltura di infante di sesso femminile con corredo. La stima del sesso in questo caso è stata effettuata su una bambina di circa 40 giorni.

Per il Lazzaretto Vecchio di Venezia, nonostante la qualità degli spettri cromatografici non fosse ottimale, probabilmente a causa delle particolari condizioni tafonomiche dei denti analizzati, è stato comunque possibile stimare il sesso di tutti i campioni.

Nel caso degli individui provenienti dalle necropoli di Campochiaro (Morrione e Vicenne), l'analisi morfologica dei resti è stata integrata e supportata da quella proteomica, permettendo di confermare le ipotesi sulla stima del sesso che erano state avanzate con i metodi osteologici.

Per il contesto brasiliano di Foz do Chapecó, nonostante i campioni si presentassero particolarmente delicati e fragili, l'analisi dell'amelogenina ha permesso di ottenere i risultati sulla determinazione del sesso per tutti i denti analizzati, ottenendo un dato che altrimenti, avendo a disposizione pochissimi resti per i singoli individui, sarebbe stato impossibile ottenere, se non ricorrendo alle analisi genetiche.

In conclusione, lo studio delle proteine (collagene e amelogenina) estratte da resti antichi è risultato di supporto alle analisi tradizionali sia antropologiche per la stima del sesso in individui non adulti e in individui particolarmente frammentari, sia archeozoologiche per la determinazione della specie. Essendo l'osso un sistema aperto (Salamon et al., 2005; Demarchi, 2020), esposto all'azione di fattori ambientali come il pH o la presenza di acqua (Smith & Evans, 1980), diversamente dallo smalto dentale, nelle varie applicazioni in diversi contesti sono stati incontrati non pochi ostacoli che hanno compromesso -a volte- la qualità dei risultati. Dai dati ottenuti si può dedurre che l'ambiente di sepoltura e i processi diagenetici giocano un ruolo fondamentale nei confronti della buona riuscita delle analisi. Nonostante questo, però, grazie all'approccio proteomico è stato possibile dar voce a tutti quei frammenti che altrimenti sarebbero rimasti indeterminati e che quindi non avrebbero contribuito allo studio antropologico e archeozoologico.

Bibliografia

- Abelson P.H., Geochemistry of organic substances. In: Abelson PH, editor. Researches in geochemistry, vol. 1. Chichester: Wiley; pp. 79–103 (1959).
- Acsádi G., Nemeskeri J. History of human life span and mortality. Akadémiai Kiadó, Budapest (1970).
- Aiello G., Barra D., Collina C., Piperno M., Guidi A., Stanislao C., Saracino M., Donadio C., Geomorphological and paleoenvironmental evolution in the prehistoric framework of the coastland of Mondragone, southern Italy. *Quat. Int.* 493, 70–85 (2018) <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2018.06.041>.
- Álvarez-Lao D.J., Rivals F., Sánchez-Hernández C., Blasco R., Rosell J., Ungulates from Teixoneres Cave (Moià, Barcelona, Spain): Presence of cold-adapted elements in NE Iberia during the MIS 3, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, Volume 466, pp. 287-302, ISSN 0031-0182 (2017), <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2016.11.040>.
- Armstrong W.G., Halstead L.B., Reed F.B., Wood L., Fossil proteins in vertebrate calcified tissues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*B301(1106):301–43 (1983).
- Arrighi S., Moroni A., Tassoni L., Boschini F., Badino F., Bortolini E., Paolo B., Crezzini J., Figus C., Forte M., Lugli F., Marciani G., Oxilia G., Negrino F., Riel-Salvatore J., Romandini M., Spinapolice E.E., Peresani M., Ronchitelli A., Benazzi S., Bone tools, ornaments and other unusual objects during the Middle to Upper Palaeolithic transition in Italy. *Quaternary International*. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2019.11.016> (2020a).
- Arrighi S., Moroni A., Tassoni L., Boschini F., Badino F., Bortolini E., Boscato P., Crezzini J., Figus C., Forte M., Lugli F., Marciani G., Oxilia G., Negrino F., Riel-Salvatore J., Romandini M., Spinapolice E.E., Peresani M., Ronchitelli A., Benazzi S., Bone tools, ornaments and other unusual objects during the Middle to Upper Palaeolithic transition in Italy. *Quaternary International* (2020b).
- Arrighi S., Bortolini E., Tassoni L., Benocci A., Manganello G., Spagnolo V., Foresi L.M., Bambini A.M., Lugli F., Badino F., Aureli D., Boschini F., Figus C., Marciani G., Oxilia G., Silvestrini S., Cipriani A., Romandini M., Peresani M., Ronchitelli A., Moroni A. & Benazzi S., Backdating systematic shell ornament making in Europe to 45,000 years ago. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 12 (2020c).

- Arslan E.A., “Le Monete delle Necropoli di Campochiaro e la Monetazione Anonima Beneventana nel VII Secolo.” in G. de Benedettis (ed). *I Beni Culturali nel Molise: Il Medioevo*. Campobasso: Istituto regionale per gli studi del Molise “V. Cuoco.” pp.87-131, 387-391 (2004).
- Barker A., Venables B., Stevens S. M., Seeley K.W., Wang P., Wolverton S., An optimized approach for protein residue extraction and identification from ceramics after cooking. *J. Archaeol. Method Theory* **19**, 407–439 (2012).
- Bartolomei G., Broglio A., Cattani L., Cremaschi M., Lanzinger M., Leonardi P., Nuove ricerche nel deposito pleistocenico della Grotta di Paina sui Colli Berici (Vicenza), *Atti dell’Istituto Veneto di Scienza, Lettere ed Atti*, (Tomo CXLVI): pp. 111-163 (1987-88).
- Bartolomei G., Broglio A., Palma di Cesnola A., *Chronostratigraphie et écologie de l’Epigravettien en Italia*. IN: D. De Sonneville-Bordes (ed.), *La fin des temps glacières en Europe – Chronostratigraphie et écologie des cultures du Paléolithique final*. Actes du Coll. Internat. C.N.R.S., 271. Talence, 24-28 maggio 1977, pp. 297-324 (1977).
- Bartolomei G., Nota preliminare sulla fauna della Grotta Maggiore di S. Bernardino nei Colli Berici (Vicenza). *Annali dell’Università di Ferrara*, III, (7): pp- 119-125 (1960).
- Belcastro M.G., Bonfiglioli B., Mariotti V. “Il popolamento del territorio di Campochiaro in epoca altomedievale. I dati antropologici della necropoli di Vicenne.” in: *I Longobardi dei ducati di Spoleto e Benevento: atti del XVI Congresso internazionale di studi sull’alto medioevo, Spoleto, 20-23 ottobre 2002, Benevento, 24-27 ottobre 2002*. Spoleto: Centro italiano di studi sull’alto Medioevo. pp. 1009-1030 (2003).
- Belcastro M.G., Facchini F., “La Popolazione Altomedievale di Vicenne-Campochiaro Studio Antropologico.” in G. de Benedettis (ed). *I Beni Culturali nel Molise: Il Medioevo*. Campobasso: Istituto regionale per gli studi del Molise “V. Cuoco”. pp. 133-150 (2004).
- Belcastro M.G., Facchini F., *Anthropological and Cultural Features of a Skeletal Sample of Horsemen from the Medieval Necropolis of Vicenne-Campochiaro (Molise, Italy)*. *Collegium Antropologicum*. 25(2). pp. 387-401 (2001).
- Belcastro M.G., Facchini F., Fulcheri E., “Dismorfosi Cranio-facciale della Tomba 112 della Necropoli Altomedievale di Vicenne-Campochiaro (CB, Molise).” in E. Pacciani, R. Boano, M. Micheletti (eds). *Antropologia del Medioevo: Biologia e cultura: le Alpi e la Penisola*. Arezzo: L.P. Grafiche. pp. 56-59 (2002).

- Belcastro M.G., Facchini F., Neri R., Mariotti V., *Skeletal markers of activity in the early middle ages necropolis of Vicenne-Campochiaro (Molise, Italy)*. *Journal of Paleopathology*. Vol. 13(3). pp. 9-20 (2001).
- Belcastro M.G., Rastelli E., Mariotti V., Consiglio C., Facchini F. & Bonfiglioli B., *Continuity or discontinuity of the life-style in central Italy during the Roman imperial age-early middle ages transition: Diet, health, and behavior*. *American Journal of Physical Anthropology*, 132(3). pp. 381-94 (2007).
- Belcastro M.G., Gasparini A., Lugli F., Silvestrini S., Marchetta I., Benazzi S., *Biological sex vs. archaeological gender: enamel peptide analysis of the horsemen of the Early Middle Age necropolises of Campochiaro (Molise, Italy)*. *Journal of Archaeological Science: Reports*, in review
- Belluomini G., Calderoni G., Collina C., Fedi M., Fiore I., Gallotti R., Garofalo B., Pennacchioni M., Piperno M., Salvadei L., Santangelo N., Santo A., Tagliacozzo A., *La grotta di Roccia san Sebastiano (Mondragone, CE)*. In: *Atti XL Riunione Scientifica "Strategie Di Insediamiento Tra Lazio e Campania in Età Preistorica e Protostorica*, pp. 319–333 (2007).
- Benazzi S., Douka K., Fornai C., Bauer C.C., Kullmer O., Svoboda J., Pap I., Mallegni F., Bayle P., Coquerelle M., Condemi S., Ronchitelli A., Harvati K., Weber G.W., *Early dispersal of modern humans in Europe and implications for Neanderthal behaviour*. *Nature*. Nov 2;479(7374):525-8. doi: 10.1038/nature10617 (2011).
- Benazzi S., Slon S., Talamo S., Negrino F., Peresani M., Bailey S.E., Sawyer S., Panetta D., Vicino G., Starnini E., Mannino M.A., Salvadori P.A., Meyer M., Pääbo S., Hublin J.-J. *The makers of the protoaurignacian and implications for neanderthal extinction*. *Science* 348, 793–796 (2015).
- Benazzi S., Arrighi S., Badino F., Bortolini E., Figus C., Lugli F., Marciani G., Oxilia G., Romandini M., Silvestrini S., Boscato P., Cipriani A., Moroni A., Negrino F., Peresani M., Pini R., Ravazzi C., Ronchitelli A., Spinapolice E.E, *Peopling dynamics in the Mediterranean area between 45 and 39 ky ago: State of art and new data*, *Quaternary International*, Volume 551, pp. 1-6 ISSN 1040-6182, (2020) <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2020.06.029>.
- Billi A., Bosi V., De Meo A., *Structural characterization of the Massico Mount in the frame of the Quaternary evolution of the coastal depressions of the Garigliano and Volturno rivers (northern Campania)*. *Italian Journal of Quaternary Sciences* 10, 15–26 (1997).

- Binford L., *Bones, ancient men and modern myths*. Academic Press: New York (1981).
- Bleasdale M., Richter K.K., Janzen A., Brown S., Scott A., Zech J., Wilkin S., Wang K., Schiffels S., Desideri J., Besse M., Reinold J., Saad M., Babiker H., Power R.C., Ndiema E., Ogola C., Manthi F.K., Zahir M., Petraglia M., Trachsel C., Nanni P., Grossmann J., Hendy J., Crowther A., Roberts P., Goldstein C & Boivin N., Ancient proteins provide evidence of dairy consumption in eastern Africa. *Nat Commun* **12**, 632 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20682-3>
- Bökönyi S., A new method for determination of the number of individuals in animal bone remains. *American Journal of Archaeology*, (74): pp. 291-292 (1970).
- Bona A., Papai Z., Maasz G., Toth G. A., Jambor E., Schmidt J., Toth C., Farkas C., Mark L., Mass spectrometric identification of ancient proteins as potential molecular biomarkers for a 2000-year-old osteogenic sarcoma. *PLOS ONE* **9**, e87215 (2014).
- Bona I., “Gli Avari. Un popolo dell’oriente nell’Europa dell’Alto Medioevo.” in E. Arslan, M. Buora (eds). *L’oro degli Avari: popolo delle steppe in Europa*. Milan: InForm edizioni. pp. 10-35 (2000).
- Bonomo M., Costa Angrisani R., Apolinaire E., Noelli F.S., A model for the guarani expansion in the La Plata Basin and littoral zone of southern Brazil. *Quaternary International* 356, pagg. 54-73. doi:10.1016/j.quaint.2014.10.050 (2015).
- Borzatti von Lowerstern E., La grotta-riparo di Uluzzo C (campagna di scavi 1964). *Rivista di Scienze Preistoriche* XX, 1–31 (1965).
- Borzatti von Lowerstern E., Magaldi D. Risultati conclusivi dello studio paleontologico e sedimentologico della Grotta di Uluzzo C (Nardò-Lecce). *Rivista di Scienze Preistoriche* 21, 16–64 (1966).
- Boscato P., Crezzini J. Middle-Upper Palaeolithic transition in Southern Italy: Uluzzian macromammals from Grotta del Cavallo (Apulia). *Quaternary International* 252, 90–98 (2012).
- Brandt L.Ø. & Mannering U. Taxonomic identification of Danish Viking Age shoes and skin objects by ZooMS (Zooarchaeology by mass spectrometry). *J Proteomics*. Jan 16;231:104038. (2021) doi: 10.1016/j.jprot.2020.104038
- Broglio A., Le industrie musteriane della Grotta del Broion. *Memorie del Museo Civico di Storia Naturale di Verona*, (12): pp. 161-281 (1965).

- Broglia A., Cremaschi M., Peresani M., Bertola S., Bolognesi L., De stefani M., Fiocchi C., Gurioli F., Marini D., L'Aurignacien dans le territoire préalpin: La Grotte de Fumane. In: Vasil'ev S.A., Soffer O., Kozłowski J., eds., *Perceived landscapes and built environments. The cultural geography of Late Palaeolithic Eurasia*, Actes XIV UISPP Congrès, Section: Paléolithique supérieur, Coll 6.2 & 6.5, BAR International Series, (1122): pp. 93-104 (2003a).
- Broglia A. Observations sur la Chronologie de l'Autignacien en Vénétie. In: Widemann F., Taborin Y., Eds., *Chronologies Géophysiques et Archéologiques du Paléolithique supérieur*, Comptes-rendus du Colloque International de Ravello (3-8 mai 1994), Edipuglia, Bari, pp. 193-196 (2003b).
- Broglia A., Gurioli F., De Stefani M., Grotta del Col della Stria (Mossano, Prov. Di Vicenza). *Notiziario della Rivista di Scienze Preistoriche*, LV, 508 p. (2005).
- Brown S., Higham T., Slon V., Pääbo, Meyer M., Douka K., Brock F., Comeskey D., Procopio N., Shunkov M., Derevianko A. & Buckley M., Identification of a new hominin bone from Denisova Cave, Siberia using collagen fingerprinting and mitochondrial DNA analysis. *Sci Rep* **6**, 23559 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep23559>
- Brown S., Kozlikin M., Shunkov M., Derevianko A., Higham T., Douka K., Korzow Richter K., Examining collagen preservation through glutamine deamidation at Denisova Cave, *Journal of Archaeological Science*, Volume 133, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.jas.2021.105454>.
- Buckley M. Ancient collagen reveals evolutionary history of the endemic South American 'ungulates'. *Proc Biol Sci* May 7;282(1806):20142671. (2015) doi: 10.1098/rspb.2014.2671.
- Buckley M. Paleoproteomics: An Introduction to the Analysis of Ancient Proteins by Soft Ionisation Mass Spectrometry. In: Lindqvist C., Rajora O. (eds) *Paleogenomics. Population Genomics*. Springer, Cham. (2018) https://doi.org/10.1007/13836_2018_50.
- Buckley M., Collins M. & Thomas-Oates J. A method of isolating the collagen (I) alpha 2 chain carboxyteleopeptide for species identification in bone fragments. *Analytical Biochemistry*, 374(2), 325–334 (2008).
- Buckley M., Collins M., Thomas-Oates J., Wilson J. C., Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 3843–3854 (2009).

- Buonasera T., Eerkens J., de Flamingh A., Engbring L., Yip J., Li H., Haas R., DiGiuseppe D., Grant D., Salemi M., Nijmeh C., Arellano M., Leventhal A., Phinney B., Byrd B.F., Malhi R.S., Parker G. A comparison of proteomic, genomic, and osteological methods of archaeological sex estimation. *Sci Rep.* 2020 Jul 17;10(1):11897. doi: 10.1038/s41598-020-68550-w.
- Caldarelli S. Arqueologia preventiva na UHE Foz do Chapeco, SC/RS. Relatório final. Florianópolis: Scientia Consultoria Científica (2010).
- Cappellini E., Jensen L.J., Szklarczyk D., Ginolhac A., da Fonseca R.A.R., Stafford T.W. Jr, Holen S.R., Collins M., Orlando L., Willerslev E., Gilbert M.T.P. & Olsen J.V., Proteomic analysis of a pleistocene mammoth femur reveals more than one hundred ancient bone proteins. *J Proteome Res.* 11(2):917–26 (2012).
- Cappellini E., Welker F., Pandolfi L., Ramos-Madrigal J., Samodova D., Rütther P.L., Fotakis A.K., Lyon D., Moreno-Mayar J.V., Bukhsianidze M., Rakownikow Jersie- Christensen R., Mackie M., Ginolhac A., Ferring R., Tappen M., Palkopoulou E., Dickinson M.R., Stafford T.W., Chan Y.L., G'otherstr'om A., Nathan S.K.S.S., Heintzman P.D., Kapp J.D., Kirillova I., Moodley Y., Agusti J., Kahlke R.D., Kiladze G., Martínez-Navarro B., Liu S., Sandoval Velasco M., Sinding M.H.S., Kelstrup C.D., Allentoft M.E., Orlando L., Penkman K., Shapiro B., Rook L., Dal'en L., Gilbert M.T.P., Olsen J.V., Lordkipanidze D., Willerslev E., Early Pleistocene enamel proteome from Dmanisi resolves *Stephanorhinus* phylogeny. *Nature* 574, 103–107. (2019) <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1555-y>.
- Cardoso H.F.V., Sample-specific (universal) metric approaches for determining the sex of immature human skeletal remains using permanent tooth dimensions. *J. Archaeol. Sci.* 35, 158–168 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jas.2007.02.013>.
- Castiblanco G.A., Rutishauser D., Ilag L.L., Martignon S., Castellanos J.E., Mejía W., Identification of proteins from human permanent erupted enamel. *Eur. J. Oral Sci.* 123, 390–395. (2015) <https://doi.org/10.1111/eos.12214>.
- Cattani L., Steppe environments at the margin of the Venetian Pre-Alps during the Pleniglacial and Late-Glacial periods. In: Cremaschi M., Ed., *The Loess in Northern and Central Italy: a Loess Basin between the Alps and the Mediterranean Region, Quaderni di Geodinamica Alpina e Quaternaria*, (1): pp. 133-137 (1990).

- Ceglia V., “Presenze Funerarie di Etá Altomedievale in Molise. Le Necropoli di Campochiaro e La Tomba del Cavaliere.” in G. Roma (ed). *I Longobardi del Sud*. Roma: Giorgio Bretschneider Editore. pp. 241-256 (2010).
- Ceglia V., “Varieta’ di influssi culturali nelle necropoli di Campochiaro: Considerazioni preliminari” in G. de Benedettis (ed). *I Beni Culturali nel Molise: Il Medioevo* (2004).
- Ceglia V., Genito B., “La necropoli altomedievale di Vicenne a Campochiaro.” In: S. Capini, A. Di Niro. (eds) *Samnium: Archeologia del Molise*. Roma: Quasar. pp. 329-338 (1991).
- Ceglia V., Marchetta, I., “Nuovi dati dalla necropoli di Vicenne a Campochiaro.” in C. Ebanista, M. Rotili (eds). *La trasformazione del mondo romano e le grandi migrazioni. Nuovi popoli dall'Europa settentrionale e centro-orientale alle coste del Mediterraneo. Atti del convegno internazionale di studi. Cimitile-Santa Maria Capua Vetere, 16-17 giugno 2011. Giornate sulla tarda antichità e il Medioevo*. San Vitaliano: Tavolario. pp. 217-238 (2012).
- Chen F., Welker F., Shen C.-C., Bailey S. E., Bergmann I., Davis S., Xia H., Wang H., Fischer R., Freidline S.E., Yu T.-L., Skinner M.M., Stelzer S., Dong G., Fu Q., Dong G., Wang J., Zhang D., Hublin J.-J., A late Middle Pleistocene Denisovan mandible from the Tibetan Plateau. *Nature* **569**, 409–412 (2019).
- Christensen A.M., Passalacqua N.V., Bartelink E.J., Forensic Anthropology: Current Methods and Practice. Elsevier. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20130097605> (2014).
- Cleland T.P. & Schroeter E.R., A Comparison of Common Mass Spectrometry Approaches for Paleoproteomics, *Journal of Proteome Research* **17** (3), 936-945 (2018) DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00703.
- Cliff A., Smallam-Raynor M., Stevens P., Controlling the geographical spread of infectious disease: plague in Italy, 1347-1851. *Acta med-hist Adriat*; **7**(1);197-236 (2009).
- Collina C., Gallotti R., L’industria litica di Grotta di Roccia San Sebastiano (Mondragone, Caserta). Risultati dello studio tecnologico. In: XL Riunione Scientifica IIPP, pp. 331–347 Firenze (2007).
- Collina C., Fiore I., Gallotti R., Pennacchioni M., Piperno M., Salvadei L., Tagliacozzo A., Il gravettiano di Roccia san Sebastiano (Mondragone, Caserta). In: *Il Tardiglaciale in Italia – Lavori in Corso*, pp. 133–143 (2008).

- Collina C., Marciani G., Martini I., Donadio C., Repola L., Bortolini E., Arrighi S., Badino F., Figus C., Lugli F., Oxilia G., Romandini M., Silvestrini S., Piperno M., Benazzi S., Refining the Uluzzian through a new lithic assemblage from Roccia San Sebastiano (Mondragone, southern Italy), *Quaternary International*, Volume 551, Pages 150-168, ISSN 1040-6182 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2020.03.056>.
- Collins M.J., Nielsen-Marsh C.M., Hiller J., Smith C.I., Roberts J.P., Prigodich R.V., Wess T.J., Csapo J., Millard A., Turner-Walker G., The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry* 44, 383–394 (2002).
- Collins M. & Demarchi B., Amino acid racemization, paleoclimate. In: *Encyclopedia of Scientific Dating Methods*, 47-48. Springer (2015).
- Colonese A.C., Hendy J., Lucquin A., Speller C. F., Collins M. J., Carrer F., Gubler R., Kühn M., Fischer R., Craig O. E., New criteria for the molecular identification of cereal grains associated with archaeological artefacts. *Sci. Rep.* **7**, 6633 (2017).
- Costa V., Studio antropologico dei non-adulti inumati della necropoli di Valdaro (VII-VIII secolo d.C.), tesi di laurea triennale in Laboratorio di Antropologia Archeologica, corso di laurea in Beni Culturali, Università di Bologna, anno accademico 2017/2018
- Coutu A. N., Whitelaw G., le Roux P., Sealy J., Earliest evidence for the ivory trade in Southern Africa: Isotopic and ZooMS analysis of seventh–tenth century ad ivory from KwaZulu-Natal. *Afr. Archaeol. Rev.* **33**, 411–435 (2016).
- Covington A.D., Song L., Suparno O, Link-lock: the mechanism of stabilising collagen by chemical reactions. *World Leather* 25 (5), 35e43 (2010).
- Crocker S.L., Reed W., Donlon D., Comparative cortical bone thickness between the long bones of humans and five common non-human mammal taxa. *Forensic Sci Int [Internet]* 260:104.e1-104.e17 (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.12.022>
- d’Errico F., Zilhao J., Julien M., Baffier D., Pelegrin J., Neandertal acculturation in Western Europe? A critical review of the evidence and its interpretation. *Curr. Anthropol.* 39 (Suppl. 1.), S1–S44 (1998).
- d’Errico F., Borgia V., Ronchitelli A. Uluzzian bone technology and its implications for the origin of behavioural modernity. *Quat Int* 259:59-71(2012).

- De Stefani M., Gurioli F., Ziggiotti S., Il Paleolitico superiore del Riparo del Broion nei Colli Berici (Vicenza). *Rivista di Scienze Preistoriche*, Supplemento (1): pp 93-107 (2005).
- De Stefani M., Dini M., Klempererova H., Peresani M., Ranaldo F., Ronchitelli A., Ziggiotti S., Continuity and replacement in flake production across the middleupper palaeolithic transition: a view over the Italian Peninsula. Flakes not blades: the role of flake production at the onset of the upper palaeolithic in Europe. *Mettmann* 135–151 (2012).
- De Vingo P., “Riding to Walhalla: The Role of Horses and Horsemen in Italian Funerary Rituals in the Early Middle Ages.” in M. Rotili (ed). *Tra i Longobardi del Sud: Arechi II e il Ducato di Benevento*. Padua: Il Poligrafo. pp. 537-566 (2017).
- Dekker J., Sinet-Mathiot V., Spithoven M., Smit B., Wilcke A., Welker F., Verpoorte A., Soressi M., Human and cervid osseous materials used for barbed point manufacture in Mesolithic Doggerland, *Journal of Archaeological Science: Reports*, Volume 35, 102678, ISSN 2352-409, <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102678> (2021).
- Demarchi B., Hall S., Roncal-Herrero T., Freeman C., Woolley J., Crisp M.K., Wilson J.C., Fotakis A., Fischer R., Kessler B., Rakownikow Jersie-Christensen R., Olsen J., Haile J., Thomas J., Marean C., Parkington J., Presslee S.L., Lee-Thorp J., Ditchfield P., Hamilton J.F., Ward M.W., Wang C.M., Shaw M.D., Harrison T., Dominguez-Rodrigo M., MacPhee R., Kwekason A., Ecker M., Kolska Horwitz L., Chazan M., Kröger R., Thomas-Oates J.E., Harding J., Cappellini E., Penkman K.E.H. & Collins M.J., 'Protein sequences bound to mineral surfaces persist into deep time', *eLife*, vol. 5, no. September, e17092, pp. 1-50 (2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.17092>
- Demarchi B., Amino acids and proteins in fossil biominerals, An introduction for Archaeologists and Palaeontologists, *New Analytical Methods in Earth and Environmental Science*, Wiley Blackwell, (2020).
- Dickinson M.R., Lister A.M & Penkman K.E.H., A new method for enamel amino acid racemization dating: A closed system approach. *Quat. Geochron.*, 50: 29-46 (2019).
- Dinnis R., Bessudnov A., Reynolds N., Deviese T., Pate A., Sablin M., Sinitsyn A., Higham T., New data for the early upper palaeolithic of Kostenki (Russia). *J. Hum. Evol.* 127, 21–40 (2019).
- Dupras T.L., Schultz J.J., Wheeler S.M., Williams L.J., *Forensic Recovery of Human Remains: Archaeological Approaches*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press (2012).

- Ebanista C., “Gli usi funerari nel ducato di Benevento: alcune considerazioni sulle necropoli campane e molisane di VI-VIII secolo” in C. Ebanista, M. Rotili (eds). *La trasformazione del mondo romano e le grandi migrazioni. Nuovi popoli dall'Europa settentrionale e centro-orientale alle coste del Mediterraneo. Atti del convegno internazionale di studi. Cimitile-Santa Maria Capua Vetere, 16-17 giugno 2011. Giornate sulla tarda antichità e il Medioevo*. San Vitaliano: Tavolario. pp. 339-366 (2011).
- Ebsen J.A., Haase K., Larsen R., Sommer D.V.P., Brandt L.Ø., Identifying archaeological leather – discussing the potential of grain pattern analysis and zooarchaeology by mass spectrometry (ZooMS) through a case study involving medieval shoe parts from Denmark. *J. Cult. Herit.* **39**, 21–31 (2019).
- Fedele A., Marchetta I., Colombo D., “Ritualità e rappresentazione funeraria nelle tombe di Vicenne (Campochiaro, CB). Una sintesi.” in C. Ebanista, M. Rotili (eds). *Prima e Dopo Alboino: sulle tracce dei longobardi*. San Vitaliano: Tavolario. pp. 295-314 (2019).
- Fernández-Jalvo Y. & Andrews P., Atlas of taphonomic identifications 1001+ Images of fossil and recent mammal bone modification, (2016). Springer Netherlands, <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7432-1>
- Fiorini A, Curci A, Benazzi S. Spinapolice E.E. Il sistema di documentazione digitale dello scavo archeologico nel sito di Uluzzo C (Nardò, LE). *Sez. di Museol. Sci. e Nat.* **13**, 68–70 (2018).
- Fiorini A., Curci A., Spinapolice E.E. & Benazzi S. Grotta di Uluzzo C (Nardò-Lecce): risultati preliminari, strumenti e metodi dell'indagine archeologica, «FOLD&R Italy», 440, 2019, pp. 1-18 (2019).
- Froment C., Hourset M., Sàenz-Oyhérégué N., Muton-Barbosa E., Willmann C., Zanolli C., Esclassan R., Donat R., Théves C., Burlet-Schiltz O. & Mollereau C., Analysis of 5000-year-old human teeth using optimized large-scale and targeted proteomics approaches for detection of sex-specific peptides. *J. Proteomics* **211**, 103548. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103548> (2020).
- Giaccio B., Hajdas I., Isaia R., Deino A. & Nomade S., High-precision ^{14}C and $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$ dating of the Campanian Ignimbrite (Y-5) reconciles the time-scales of climatic-cultural processes at 40ka. *Sci. Rep.*, **7**: 45940 (2017).

- Gowland R., Stewart N.A., Crowder K.D., Hodson C., Shaw H., Gron K.J. & Montgomery J., Sex estimation of teeth at different developmental stages using dimorphic enamel peptide analysis. *Am J Phys Anthropol.* 174: 859– 869 (2021) <https://doi.org/10.1002/ajpa.24231>.
- Gravina B., Bachellerie F., Caux S., Discamps E., Faivre J.P., Galland A., Michel A., Teyssandier N., Bordes J.G., No reliable evidence for a Neandertal-Ch[^]atelperronian association at La Roche-`a-Pierrot, Saint-C´esaire. *Sci. Rep.* 8, 15134 (2018).
- Griffin R.C., Chamberlain A.T., Hotz G., Penkman K.E.H. & Collins M.J., Age estimation of archaeological remains using amino acid racemization in dental enamel: A comparison of morphological, biochemical, and known ages-at-death. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 140: 244-252 (2009).
- Guilaine J., Barbaza M., Geddes D. & Vernet J. L. Prehistoric human adaptations in Catalonia (Spain). *J. Field Archaeol.* **9**(4), 407–416 (1982).
- Hao P., Ren Y., Alpert A.J., Sze S.K. Detection, evaluation and minimization of nonenzymatic deamidation in proteomic sample preparation. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP.* Oct;10(10):O111.009381 (2011). DOI: 10.1074/mcp.o111.009381.
- Hendy J., Welker F., Demarchi B. Speller C., Warinner C. & Collins M., A guide to ancient protein studies. *Nat Ecol Evol* **2**, 791–799 (2018a). <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0510-x>
- Hendy J., Colonese A.C., Franz I., Fernandes R., Fischer R., Orton D., Lucquin A., Spindler L., Anvari J., Stroud E., Biehl P. F., Speller C., Boivin N., Mackie M., Jersie-Christensen R.R., Olsen J.V., Collins M.J., Craig O.E., Rosenstock E., Ancient proteins from ceramic vessels at Çatalhöyük West reveal the hidden cuisine of early farmers. *Nat. Commun.* **9**, 4064 (2018b).
- Hendy J. Ancient protein analysis in archaeology. *Sci Adv.* 7(3):eabb9314 (2021) doi: 10.1126/sciadv.abb9314.
- Higham T., Jacobi R., Basell L., Ramsey C.B., Chiotti L., Nespoulet R., Precision dating of the Palaeolithic: a new radiocarbon chronology for the Abri Pataud (France), a key Aurignacian sequence. *J. Hum. Evol.* 61, 549–563 (2011).
- Higham T., Basell L., Jacobi R., Wood R., Ramsey C.B., Conard N.J., Testing models for the beginnings of the Aurignacian and the advent of figurative art and music: the radiocarbon chronology of Geißenklösterle. *J. Hum. Evol.* 62, 664–676 (2012).

- Higham, T., Douka, K., Wood, R., Bronk Ramsey C., Brock F., Basell L., Camps M., Arrizabalaga A., Baena J., Barroso-Ruíz C., Bergman C., Boitard C., Boscato P., Caparrós M., Conard N.J., Draily C., Froment A., Galván B., Gambassini P., Garcia-Moreno A., Grimaldi S., Haesaerts P., Holt B., Iriarte-Chiapusso M.J., Jelinek A., Jordá Pardo J. F., Maíllo-Fernández J-M., Marom A., Maroto J., Menéndez M., Metz L., Morin E., Moroni A., Negrino F., Panagopoulou E., Peresani M., Pirson S., de la Rasilla M., Riel-Salvatore J., Ronchitelli A., Santamaria D., Semal P., Slimak L., Soler J., Soler N., Villaluenga A., Pinhasi R. & Jacobi R. The timing and spatiotemporal patterning of Neanderthal disappearance. *Nature* **512**, 306–309 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13621>
- Hublin J.J., Talamo S., Julien M., David F., Connet N., Bodu P., Vandermeersch B., Richards M.P., Radiocarbon dates from the grotte du Renne and saint-césaire support a neandertal origin for the châtelperronian. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 18743–18748 (2012).
- Hublin J.-J., The modern human colonization of western Eurasia: when and where? *Quart. Sci. Rev.* **18**, 194–210 (2015).
- Huq N., Tseng A., Chapman G., Partial amino acid sequence of osteocalcin from an extinct species of ratite bird. *Biochem Int.*;21(3):491–6 (1989).
- Jensen, T.Z.T., Sjöström, A., Fischer, A., Rosengren E., Lanigan L.T., Bennike O., Korzow Richter K., Gron K.J., Mackie M., Mortensen M.F., Sørensen L., Chivall D., Højholt I., Taurozzi A.J., Olsen J., Schroeder H., Milner N., Sørensen M & Collins M.J., An integrated analysis of Maglemose bone points reframes the Early Mesolithic of Southern Scandinavia. *Sci Rep* **10**, 17244 (2020a). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74258-8>
- Jensen T.Z.T., Mackie M., Taurozzi A.J., Lanigan L.T., Gundelach C., Olsen J., Sørensen S.A., Collins M.J., Sørensen M., Schroeder H. The biomolecular characterization of a finger ring contextually dated to the emergence of the Early Neolithic from Syltholm, Denmark. *R. Soc. Open Sci.* **7**, 191172 (2020b).
- Jones J.D., Vallentyne J.R. Biogeochemistry of organic matter. *Geochim Cosmochim Acta.*21:1–34 (1960).
- Kadler K.E., Holmes D.F., Trotter J.A., Chapman J. Collagen fibril formation. *Biochem J.* **316**:1–11 (1996).
- Kirby D.P., Buckley M., Promise E., Trauger S.A., Holdcraft T.R., Identification of collagen-based materials in cultural heritage. *Analyst* **138**, 4849–4858 (2013).

- Kohn M.J., Schoeninger M.J., Barker W.W. Altered states: effects of diagenesis on fossil tooth chemistry. *Geochim Cosmochim Acta* 63:2737-2747 (1999).
- Kuckova S., Cejnar P., Santrucek J., Hynek R., Characterization of proteins in cultural heritage using MALDI-TPF and LC-MS/MS mass spectrometric techniques, *Physical Sciences Reviews*, vol. 4, no. 5, pp. 20180011(2019). <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0011>
- Leonardi P., Il covolo fortificato di Trene nei Colli Berici Orientali (Vicenza); stazione preistorica con industria gravettiana. *Bullettino di Paleontologia Italiana*, N.S. XIII, (68): pp. 1-37 (1959).
- Leonardi P., Broglio A., *Paleolitico superiore in situ nel deposito pleistocenico della Grotta di S. Bernardino nei Colli Berici orientali (Vicenza)*. *Atti dell'Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti*, (Tomo CXIX): pp. 435-449 (1960/1961).
- Leonardi P., Broglio A., Quatrième campagne de fouilles dans la Grotte de Broion, Colli Berici, Vicenza, (Italie). *Bulletin de la Société d'études et de Recherches Préhistoriques de Les Eyzies*, (10): pp. 1-6 (1961).
- Leonardi P., Broglio A., Pasa A., Ronchetti G. La stazione preistorica del Covolo di Paina nei Colli Berici (Vicenza). *Rivista di Scienze Preistoriche*, (XVII): pp. 77-122 (1962a).
- Leonardi P., Broglio A. Il Paleolitico superiore dei Colli Berici. *Arheoloski Vestnik*, (13-14): pp. 109-128 (1962b).
- Leonardi P., Broglio A. Il deposito della Grotta del Broion. *Rass. Spel. It.*, (7): pp. 1-12 (1963).
- Linderholm J. & Geladi P. 'Classification of Archaeological Soil and Sediment Samples Using near Infrared Techniques', *NIR news*, 23(7), pp. 6–9. (2012) doi: [10.1255/nirn.1329](https://doi.org/10.1255/nirn.1329).
- López-García J. M., Blain H.-A., Burjachs F., Ballesteros A., Allué E., Cuevas-Ruiz G.E., Rivals F., Blasco R., Morales J.I., Rodríguez Hidalgo A., Carbonelli E., Serrat D., Rosell J., A multidisciplinary approach to reconstructing the chronology and environment of southwestern European Neanderthals: The contribution of Teixoneres cave (Moià, Barcelona, Spain). *Quat. Sci. Rev.* **43**, 33–44 (2012).
- Loth S.R. & Henneberg M., Sexually dimorphic mandibular morphology in the first few years of life. *Am. J. Phys. Anthropol.* 115, 179–186 (2001). <https://doi.org/10.1002/ajpa.1067>.
- Lourdeau A., Carbonera M., Santos M.C.P., Hoeltz S., Fontugne M., Hatte C., Francisco S., Monteiro S., Rosina P., Lucas L. de O. e, Costa A., Da Foucher C., Ramalho J.B., Kuczkovski F., Campos

- J.B., Viana S.A., Herberts A.L. Pre-historia na foz do rio Chapeco Chapeco. Introducao Historico das pesquisas e descricao da area. Cadernos do CEOM: Estudos arqueologicos regionais V. 29, pp. 220-242. (2016). doi:<http://dx.doi.org/10.22562/2016.45.09>
- Lowenstein J.M. & Ryder O.A. Immunological systematics of the extinct quagga (Equidae). *Experientia*. (1985);41(9):1192–3.
- Lucquin A., Gibbs K., Uchiyama J., Saul H., Ajimoto M., Eley Y., Radini A., Heron C. P., Shoda S., Nishida Y., Lundy J., Jordan P., Isaksson S., Craig O. E., Ancient lipids document continuity in the use of early hunter-gatherer pottery through 9,000 years of Japanese prehistory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 3991–3996 (2016).
- Lugli F., Di Rocco G., Vazzana A., Genovese F., Pinetti D., Cilli E., Carile M.C., Silvestrini S., Gabanini G., Arrighi S., Buti L., Bortolini E., Cipriani A., Figus C., Marciani G., Oxilia G., Romandini M., Sorrentino R., Sola M. & Benazzi S., Enamel peptides reveal the sex of the Late Antique “Lovers of Modena”. *Sci. Rep.* **9**, 13130 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49562-7>.
- Lugli F., Figus C., Silvestrini S., Costa V., Bortolini E., Conti S., Peripoli B., Nava A., Sperduti A., Lamanna L., Bondioli L., Benazzi S., Sex-related morbidity and mortality in non-adult individuals from the Early Medieval site of Valdarò (Italy): the contribution of dental enamel peptide analysis, *Journal of Archaeological Science: Reports*, Volume 34, Part A, 102625, ISSN 2352-409X, (2020) <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102625>.
- Lyman L.D., *Vertebrate Taphonomy*. Cambridge: Cambridge University Press (1994).
- Mackie M., Rùther P., Samodova D., Di Gianvincenzo F., Granzotto C., Lyon D., Peggie D. A., Howard H., Harrison L., Jensen L. J., Olsen J. V., Cappellini E., Palaeoproteomic Profiling of Conservation Layers on a 14th Century Italian Wall Painting *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 7369 (2018).
- Marciani G., Ronchitelli A., Arrighi S., Badino F., Bortolini E., Boscato P., Boschin F., Crezzini J., Delpiano D., Falcucci A., Figus C., Lugli F., Oxilia G., Romandini M., Riel-Salvatore J., Negrino F., Peresani M., Spinapolice E.E., Moroni A. & Benazzi S. Lithic techno-complexes in Italy from 50 to 39 thousand years BP: an overview of lithic technological changes across the Middle-Upper Palaeolithic boundary. *Quat. Int* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2019.11.005>.

- Martisius N.L., Welker F., Dogandžić T., Grote M.N., Rendu W., Sinet-Mathiot V., Wilcke A., McPherron S.J.P., Soressi M., & Steele T.E. Non-destructive ZooMS identification reveals strategic bone tool raw material selection by Neandertals. *Sci Rep* **10**, 7746 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64358-w>
- Mellars P. The impossible coincidence: a single-species model for the origins of modern human behavior in Europe. *Evol. Anthropol.* **14**, 12–27 (2005).
- Miller C.A., Hwang S.J., Cotter M.M., Vorperian H.K. Cervical vertebral body growth and emergence of sexual dimorphism: a developmental study using computed tomography. *J. Anat.* **234**, 764–777 (2019). <https://doi.org/10.1111/joa.12976>.
- Miller G.H, Beaumont P.B., Jull A.J.T. & Johnson B., Pleistocene geochronology and palaeothermometry from protein diagenesis in ostrich eggshells: Implications for the evolution of modern humans. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **337**: 149-157 (1992).
- Monge Calleja A.M., Aranda C.M., Santos A.L., Luna L.H. Evaluation of the auricular surface method for non-adult sex estimation on the Lisbon documented collection. *Am. J. Phys. Anthropol.* (2020). <https://doi.org/10.1002/ajpa.24012>.
- Moroni A., Boscato P., Ronchitelli A. What roots for the Uluzzian? Modern behaviour in Central-Southern Italy and hypotheses on AMH dispersal routes. *Quat. Int.* **316**, 27–44. (2013). <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2012.10.051>.
- Moroni A., Ronchitelli A., Arrighi S., Aureli D., Bailey S.E., Boscato P., Boschini F., Capocchi G., Crezzini J., Douka K., Marciani G., Panetta D., Rinaldo F., Ricci S., Scaramucci S., Spagnolo V., Benazzi S., Gambassini P. Grotta del Cavallo (Apulia – southern Italy). The Uluzzian in the mirror. *J. Anthropol. Sci.* **96**, 1–36 (2018). <https://doi.org/10.4436/jass.96004>.
- Mueller R.C., Peste e demografia. Medioevo e Rinascimento, in Venezia e la peste. 1348- 1797, Marsilio Editori, pp. 93-96 (1980).
- Nakahori Y., Takenaka O., Nakagome Y. A human X-Y homologous region encodes “amelogenin”. *Genomics* **9**:264–269 (1991).
- Nielsen-Marsh C.M. Stegemann C., Hoffmann R., Smith T., Feeney R., Toussaint M., Harvati K., Panagopoulou E., Hublin J.-J., Richards M.P. Extraction and sequencing of human and Neanderthal mature enamel proteins using MALDI-TOF/TOF MS. *J. Archaeol. Sci.* **36**, 1758–1763 (2009).

- O'Brien N.A., Hulse C.A., Friedrich D.M., Van Milligen F.J., von Gunten M.K., Pfeifer F., Siesler H.W., "Miniature near-infrared (NIR) spectrometer engine for handheld applications," Proc. SPIE 8374, Next- Generation Spectroscopic Technologies V, 837404 (2012); doi: 10.1117/12.917983
- O'Brien N.A, Haley N., "HUMAN VS. NON-HUMAN BONE: A NON-DESTRUCTIVE HISTOLOGICAL METHOD. Graduate Student Theses, Dissertations, & Professional Papers. 11373" (2019).
- Ochando J., Carriòn J.S., Blasco R., Rivals F., Rufà A., Demuro M., Arnold L.J., Amoròs G., Munuera M., Fernàndez S., Rossell J., Neanderthals in a highly diverse, Mediterranean-Eurosiberian forest ecotone: The Pleistocene pollen records of Teixonerès Cave, northeastern Spain. *Quat. Sci. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2020.106429> (2020).
- Orlandi E., Ricostruzione delle abitudini alimentari mediante analisi odontosomatologiche e chimico-fisiche: il caso degli inumati della necropoli di età longobarda di Valdarò (Mn), (2013), Tesi di Laurea Magistrale, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.
- Ostrom P.H., Schall M., Gandhi H., Shen T.L., Hauschka P.V., Strahler J.R. & Gage D.A. New strategies for characterizing ancient proteins using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Geochim Cosmochim. Acta.*;64(6):1043–50 (2000).
- Painter T. J., Lindow man, Tollund man and other peat-bog bodies: the preservative and antimicrobial action of sphagnum, a reactive glycuronoglycan with tanning and sequestering properties, *Carbohydrate Polymers*, **15**, 123–42 (1991).
- Palma di Cesnola A. Il Paleolitico della Puglia. *Memorie del Museo Civico di Storia Naturale di Verona*, 15: 1-84 (1967).
- Palmer R.J., L'azione della Repubblica di Venezia nel controllo della peste. Lo sviluppo della politica governativa, in Venezia e la peste. 1348-1797, Marsilio Editori, pp. 103-110 (1980).
- Parker G.J., Yip J.M., Eerkens J.W., Salemi M., Durbin-Johnson B., Kiesow C., Haas R., Buikstra J.E., Klaus H., Regan L.A., Rocke D.M., Phinney B.S., Sex estimation using sexually dimorphic amelogenin protein fragments in human enamel. *J. Archaeol. Sci.* 101, 169–180 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jas.2018.08.011>.

- Peresani M., Cristiani E., Romandini M., The Uluzzian technology of Grotta di Fumane and its implication for reconstructing cultural dynamics in the Middle-Upper Palaeolithic transition of Western Eurasia. *J. Hum. Evol.* 91, 36–56 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2015.10.012>.
- Peresani, M., Bertola, S., Delpiano, D., Benazzi, S., Romandini, M. The Uluzzian in north Italy: insights around the new evidence at Riparo del Broion. *Archaeol. Anthropol. Sci.* (2019). <https://doi.org/10.1007/s12520-018-0770-z>.
- Poinar H.N. & Stankiewicz B.A. Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8426–8431. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8426> (1999).
- Pothier Bouchard G., Mentzer S.M., Riel-Salvatore J., Hodgkins J., Miller C.E, Negrino F., Wogelius R., Buckley M. Portable FTIR for on-site screening of archaeological bone intended for ZooMS collagen fingerprint analysis, *Journal of Archaeological Science: Reports*, Volume 26, 101862, ISSN 2352-409X (2019) <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2019.05.027>.
- Pothier Bouchard G., Riel-Salvatore J., Negrino F., Buckley M., Archaeozoological, taphonomic and ZooMS insights into The Protoaurignacian faunal record from Riparo Bombrini, *Quaternary International*, Volume 551, pp. 243-263, ISSN 1040-6182, (2020) <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2020.01.007>.
- Prager E.M., Wilson A.C., Lowenstein J.M., Sarich V.M. Mammoth albumin. *Science*; 209:287–9 (1980).
- Presslee S., Wilson J., Woolley J., Best J., Russell D., Radini A., Fischer R., Kessler B., Boano R., Collins M., Demarchi B., The identification of archaeological eggshell using peptide markers. *STAR Sci. Technol. Archaeol. Res.* **3**, 89–99 (2017).
- Procopio N., Chamberlain A.T., Buckley M. Exploring biological and geological age-related changes through variations in intra- and intertooth proteomes of ancient dentine. *J. Proteome Res.* **17**, 1000–1013 (2018).
- Ramsøe A., van Heekeren V., Ponce P., Fischer R., Barnes I., Speller C., Collins M.J. DeamiDATE 1.0: site-specific deamidation as a tool to assess authenticity of members of ancient proteomes. *J. Archaeol. Sci.* 115, 105080 (2020).
- Rebay-Salisbury K., Janker L., Pany-Kucera D., Schuster D., Spannagl-Steiner M., Waltenberger L., Salisbury R.B., Kanz F., Child murder in the Early Bronze Age: proteomic sex identification

- of a cold case from Schleinbach, Austria. *Archaeol Anthropol Sci* **12**, 265 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12520-020-01199-8>
- Ren D, Pipes GD, Liu D, Shih LY, Nichols AC, Treuheit MJ, Brems DN, Bondarenko PV. An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins. *Anal Biochem.* 2009 Sep 1;392(1):12-21. doi: 10.1016/j.ab.2009.05.018.
- Riel-Salvatore J. What is a ‘transitional’ industry? The uluzzian of southern Italy as a case study. In: *Sourcebook of Palaeolithic Transitions*. Springer New York, New York, NY, pp. 377–396 (2009). https://doi.org/10.1007/978-0-387-76487-0_25.
- Riel-Salvatore J., A niche construction perspective on the middle-upper paleolithic transition in Italy. *J. Archaeol. Method Theor* **17**, 323–355 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10816-010-9093-9>.
- Robinson N.E. & Robinson A. B. Molecular clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 944 (2001a).
- Robinson N.E. & Robinson A.B. Prediction of protein deamidation rates from primary and three-dimensional structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 4367 (2001b).
- Robinson N.E. Protein deamidation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 5283 (2002).
- Robinson N.E., Robinson Z.W., Robinson B.R., Robinson A.L., Robinson J.A., Robinson M.L. & Robinson A.B. Structure-Dependent Nonenzymatic Deamidation of Glutaminyl and Asparaginyl Pentapeptides. *The Journal of Peptide Research*, **63**(5): 426–36 (2004).
- Romandini M., *Analisi archeozoologica, tafonomica, paleontologica e spaziale dei livelli Uluzziani e tardo-Musteriani della Grotta di Fumane (VR). Variazioni e continuità strategico-comportamentali umane in Italia Nord Orientale: i casi di Grotta del Col della Stria (VI) e Grotta del Rio Secco (PN). Dottorato di ricerca in “Scienze e tecnologie per l’archeologia e i beni culturali”, 2009-2011*
- Romandini M., Peresani M., Laroulandie V., Metz L., Pastoors A., Vaquero M., Slimak L. Convergent evidence of eagle talons used by late Neanderthals in Europe: a further assessment on symbolism. *PLoS One.* **9**(7):e101278 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0101278
- Romandini M., Thun hohenstein U., Fiore I., Tagliacozzo A., Perez A., Lubrano V., Terlato G., Peresani M., « Late neandertals and the exploitation of small mammals in northern Italy: fortuity, necessity or hunting variability? », *Quaternaire*, vol. **29**/1 | (2018a), 61-67.

- Romandini M., Terlato G., Nannini N., Tagliacozzo A., Benazzi S. & Peresani M., Bears and humans, a Neanderthal tale. Reconstructing uncommon behaviors from zooarchaeological evidence in southern Europe, *Journal of Archaeological Science*, Volume 90, pp: 71-91, ISSN 0305-4403, (2018b) <https://doi.org/10.1016/j.jas.2017.12.004>.
- Romandini M., Oxilia G., Bortolini E., Peyrégne S., Delpiano D., Nava A., Panetta D., Di Domenico G., Martini P., Arrighi S., Badino F., Figus C., Lugli F., Marciani G., Silvestrini S., Menghi Sartorio J.C., Terlato G., Hublin J.-J., Meyer M., Bondioli L., Higham T., Slon V., Peresani M., Benazzi S., A late Neanderthal tooth from northeastern Italy, *Journal of Human Evolution*, Volume 147, 102867, ISSN 0047-2484, (2020) <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2020.102867>.
- Romandini M., Crezzini J., Bortolini E., Boscato P., Boschini F., Carrera L., Nannini N., Tagliacozzo A., Terlato G., Arrighi S., Badino F., Figus C., Lugli F., Marciani G., Oxilia G., Moroni A., Negrino F., Peresani M., Riel-Salvatore J., Ronchitelli A., Spinapolice E.E., Benazzi S., Macromammal and bird assemblages across the late Middle to Upper Palaeolithic transition in Italy: an extended zooarchaeological review, *Quaternary International*, Volume 55, pp. 188-223, ISSN 1040-6182, (2020) <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2019.11.008>.
- Ronchitelli A., Moroni A., Boscato P., Gambassini P. The Uluzzian 50 years later. In: Valde-Nowak, Paweł, Sobczyk, K., Nowak, M., Żrałka, J. (Eds.), *Multas Per Gentes Et Multa Per Saecula Amici Magistro Et Collegae Sui Ioanni Christopho Kozłowski Dedicant*. Kraków, pp. 71–76 (2018).
- Rosell J., Blasco R., Rivals F., Chacón M.G., Menéndez L., Morales J.I., Rodríguez-Hidalgo A., Cebrià A., Carbonell E. & Serrat D., « A stop along the way: the role of Neanderthal groups at level III of Teixoneres Cave (Moià, Barcelona, Spain) », *Quaternaire* [En ligne], vol. 21/2 | mis en ligne le 01 décembre 2010, consulté le 07 septembre 2021. URL : <http://journals.openedition.org/quaternaire/5508> ; (2010) DOI : <https://doi.org/10.4000/quaternaire.5508>
- Rosell J., Blasco R., Rivals F., Gema Chacòn M., Arilla M., Camaròs E., Rufà A., Sanchez-Hernández C., Picin A., Andrès M., Blain H-A., Lòpez-García J.M., Iriarte E., Cebrià A., A resilient landscape at Teixoneres Cave (MIS 3; Moià, Barcelona, Spain): The Neanderthals as disrupting agent. *Quat. Int.* **435**, 195–210 (2017).

- Ruggeri A., Le sepolture Guarani dell'area archeologica di Foz do Chapecò, tesi di laurea triennale in Paleoantropologia, corso di laurea in Beni Culturali, Università di Bologna, anno accademico 2020/2021
- Sala B. Interpretazione crono-bio-stratigrafica dei depositi pleistocenici della Grotta del Broion (Vicenza). *Geografia fisica e Dinamica Quaternaria*, (3): pp. 66-71 (1980).
- Sala B. Loess fauna in deposits of the shelters and caves in the Veneto region and examples in other region of Italy. In: Cremaschi M., Ed. The Loess in Northern and Central Italy: a Loess Basin between the Alps and the Mediterranean Region, *Quaderni di Geodinamica Alpina e Quaternaria*, (1): pp. 139-149 (1990).
- Salamon M., Tuross N., Arensburg B. & Weiner S. Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 13783-13788 (2005).
- Sano K., Arrighi S., Stani C., Aureli D., Boschini F., Fiore I., Spagnolo V., Ricci S., Crezzini J., Boscato P., Gala M., Tagliacozzo A., Birarda G., Vaccari L., Ronchitelli A., Moroni A., Benazzi S. The earliest evidence for mechanically delivered projectile weapons in Europe. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 1409–1414 (2019).
- Sawafuji R., Cappellini E., Nagaoka T., Fotakis A.K., Jersie-Christensen R.R., Olsen J.V., Hirata K., Ueda S., Proteomic profiling of archaeological human bone. *R. Soc. Open Sci.* 4, 161004 (2017).
- Schoeninger M.J., Hallin K., Reeser H., Valley J.W. & Fournelle J. Isotopic alteration of mammalian tooth enamel. *Int. J. Osteoarchaeol.*, 13: 11-19 (2003). <https://doi.org/10.1002/oa.653>.
- Schroeter E.R. & Cleland T.P. Glutamine deamidation: an indicator of antiquity, or preservational quality?. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 30: 251– 255 (2016). doi: [10.1002/rcm.7445](https://doi.org/10.1002/rcm.7445).
- Serra-Ràfols J.D.C., Villalta J. F., Thomas J. & Fuste M. Livret Guide des excursions B2-B3. in V Congrès International del INQUA, 5–25 (Alentours de Barcelona et Mojà, Madrid, 1957).
- Serrat D. & Albert J. F. Estudio sedimentológico de los materiales de relleno de la Cova de les Teixoneres. *Speleon* 20, 63–70 (1973).
- Silvestrini S., Romandini M., Marciani G., Arrighi S., Carrera L., Fiorini A., López-García J.M., Lugli F., Ranaldo F., Slon V., Tassoni L., Higgins O.A., Bortolini E., Curci A., Meyer M., Meyer M.C., Oxilia G., Zerboni A., Benazzi S. & Spinapolice E.E. Integrated multidisciplinary

- ecological analysis from the Uluzzian settlement at the Uluzzo C Rock Shelter, south-eastern Italy. *J. Quaternary Sci* (2021). <https://doi.org/10.1002/jqs.3341>.
- Simpson J.P., Penkman K.E.H., Demarchi B., Koon H., Collins M.J., Thomas-Oates J., Shapiro B., Stark M., Wilson J., The effects of demineralisation and sampling point variability on the measurement of glutamine deamidation in type I collagen extracted from bone, *Journal of Archaeological Science*, Volume 69, pp. 29-38, ISSN 0305-4403, (2016) <https://doi.org/10.1016/j.jas.2016.02.002>.
- Sinet-Mathiot V., Smith G.M., Romandini M., Wilcke A., Peresani M., Hublin J.-J., Welker F., Combining ZooMS and zooarchaeology to study Late Pleistocene hominin behaviour at Fumane (Italy). *Sci Rep* **9**, 12350 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48706-z>.
- Smith G.G. & Evans R.C., The effect of structure and conditions on the rate of racemization of free and bound amino acids. In: *Biogeochemistry of Amino Acids* (eds. P.E. Hare, T.C. Hoering and K. King Jr.), 257-282. New York: Wiley (1980).
- Smith T.M. & Tafforeau P. New visions of dental tissue research: Tooth development, chemistry, and structure. *Evol. Anthropol.*, 17: 213-226 (2008). <https://doi.org/10.1002/evan.20176>.
- Solazzo C., Fitzhugh W.W., Rolando C., Tokarski C., Identification of protein remains in archaeological potsherds by proteomics. *Anal. Chem.* **80**, 4590–4597 (2008).
- Spinapolice E.E., Zerboni A., Meyer M.C., Talamo S., Mariani G.S., Gliganic L.A., Buti L., Fusco M., Maiorano M.P., Silvestrini S., Sorrentino R., Vazzana A., Romandini M., Fiorini A., Curci A. & Benazzi S. Back to Uluzzo – archaeological, palaeoenvironmental and chronological context of the Mid–Upper Palaeolithic sequence at Uluzzo C Rock Shelter (Apulia, southern Italy). *J. Quaternary Sci* (2021). <https://doi.org/10.1002/jqs.3349>.
- Stewart J. R.M., Allen R.B., Jones A.K.G., Penkman K.E.H., Collins M. J. ZooMS: Making eggshell visible in the archaeological record. *J. Archaeol. Sci.* **40**, 1797–1804 (2013).
- Stewart N. A., Gerlach R.F., Gowland R.L., Gron K.J. & Montgomery J. Sex determination of human remains from peptides in tooth enamel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714926115> (2017).
- Stewart N.A., Molina G.F., Issa J.P.M., Yates N.A., Sosovicka M., Vieira A.R., Line S.R.P., Montgomery J., Fernanda R., The identification of peptides by nanoLC-MS/MS from human

- surface tooth enamel following a simple acid etch extraction. *RSC Adv.* 6, 61673–61679 (2016). <https://doi.org/10.1039/C6RA05120K>.
- Strohalm M., Kavan D., Novak P., Volny M., Havlicek V., mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Anal. Chem.* 82 (11), 4648–4651 (2010). <https://doi.org/10.1021/ac100818g>.
- Sykes G.A., Collins M.J. & Walton D.I. The significance of a geochemically isolated intracrystalline organic fraction within biominerals. *Org. Geochem.*, 23: 1059-1065 (1995).
- Tagliacozzo A., Romandini M., Fiore I., Gala M., Peresani M. Animal Exploitation Strategies during the Uluzzian at Grotta di Fumane (Verona, Italy). In: Clark J., Speth J. (eds) *Zooarchaeology and Modern Human Origins. Vertebrate Paleobiology and Paleoanthropology*. Springer, Dordrecht. (2013) https://doi.org/10.1007/978-94-007-6766-9_8
- Talamo S., Hajdinjak M., Mannino M.A., Fasani L., Welker F., Martini F., Romagnoli F., Zorzin R., Meyer M., Hublin J.J. Direct radiocarbon dating and genetic analyses on the purported Neandertal mandible from the Monti Lessini (Italy). *Sci. Rep.* 6, 29144 (2016a).
- Talamo S., Blasco R., Rivals F, Picin A., Chacón M.G., Iriarte E., Lòpez-García J.M., Blain H-A., Arilla M., Rufà A., Sanchez-Hernández C., Andrés M., Camarós E., Ballesteros A., Cebrià A., Rosell J. & Hublin J.-J., The radiocarbon approach to Neanderthals in a carnivore den site: A well-defined chronology for Teixoneres Cave (Moià, Barcelona, Spain). *Radiocarbon* 58, 247–265 (2016b).
- Tanganelli V, Zuppello M., Mariotti V. & Belcastro M.G. “Mortalità infantile nelle necropoli altomedievali di Campochiaro Vicenne e Morrione (CB, Molise).” In: *Variabilità umana tra passato e presente. Atti di Congresso*. pp. 141-146 (2014).
- Teasdale M.D., Fiddymment S., Vnouček J., Mattiangeli V., Speller C., Binois A., Carver M., Dand C., Newfield T.P., Webb C.C., Bradley D.G., Collins M. J., The York Gospels: A 1000-year biological palimpsest. *R. Soc. Open Sci.* 4, 170988 (2017).
- Thomas D.B., McGoverin C.M., Chinsamy A., Manley M., ‘Near Infrared Analysis of Fossil Bone from the Western Cape of South Africa’, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 19(3), pp. 151–159 (2011). doi: [10.1255/jnirs.926](https://doi.org/10.1255/jnirs.926).

- Tissoux H., Falgueres C., Bahain J.-J., Rosell Ardevol J., Cebria A., Carbonell E. & Serrat D., Datation par les séries de l'Uranium des occupations moustériennes de la grotte de Teixoneres (Moia, Province de Barcelone, Espagne). *Quaternaire* **17**(1), 27–33 (2006).
- Tran T.N.N., Signoli M., Fozzati L., Aboudharam G., Raoult D., Drancourt M. High Throughput, Multiplexed Pathogen Detection Authenticates Plague Waves in Medieval Venice, Italy, (2011), PLoS One doi: 10.1371/journal.pone.0016735.
- Turner-Walker G. The chemical and microbial degradation of bones and teeth. *Adv. Hum. Palaeopathol.* **4**, 3e29 (2008).
- van der Sluis L., Hollund H., Buckley M., De Louw P., Rijdsdijk K. & Kars H. Combining histology, stable isotope analysis and ZooMS collagen fingerprinting to investigate the taphonomic history and dietary behaviour of extinct giant tortoises from the Mareaux Songes deposit on Mauritius. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **416**, 80–91 (2014).
- van Doorn N.L., Hollund H. & Collins M.J. 'A novel and non-destructive approach for ZooMS analysis: ammonium bicarbonate buffer extraction', *Archaeological and Anthropological Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 281-289 (2011). <https://doi.org/10.1007/s12520-011-0067-y>.
- van Doorn N.L., Wilson J., Hollund H., Soressi M. & Collins M.J. Site-specific deamidation of glutamine: a new marker of bone collagen deterioration. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **26**: 2319-2327. (2012). <https://doi.org/10.1002/rcm.6351>.
- Villa P., Pollarolo L., Conforti J., Marr F., Biagioni C., Degano I., Lucejko J.J., Tozzi C., Pennacchioni M., Zanchetta G., Nicosia C., Martini M., Sibilio E., Panzeri L. From Neandertals to modern humans: new data on the Uluzzian. *PloS One* **13** (2018). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196786>. e0196786.
- Vincke D., Miller R., Stassart E., Otte M., Dardenne P., Collins M., Wilkinson K., Stewart J., Baeten V., Pierna J.A.F., Analysis of collagen preservation in bones recovered in archaeological contexts using NIR Hyperspectral Imaging, *Talanta*, Volume 125, pp. 181-188, ISSN 0039-9140, (2014) <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.044>.
- Wadsworth C. & Buckley M. Proteome degradation in fossils: investigating the longevity of protein survival in ancient bone. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **28**, 605–615. <https://doi.org/10.1002/rcm.6821> (2014)

- Wang N., Brown S., Ditchfield P., Hebestreit S., Kozilikin M., Luu S., Wedage O., Grimaldi S., Chazan M., Horwitz Kolska L., Spriggs M., Summerhayes G., Shunkov M., Richter Korzow K., Douka K. Testing the efficacy and comparability of ZooMS protocols on archaeological bone, *Journal of Proteomics*, Volume 233, 104078, ISSN 1874-3919, (2021) <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104078>.
- Wang Y. & Cerling T.E. A model of fossil tooth and bone diagenesis: implications for paleodiet reconstruction from stable isotopes, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, Volume 107, Issues 3–4, pp. 281-289, ISSN 0031-0182 (1994), [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0031-0182(94)90100-7).
- Wasinger V.C., Curnoe D., Bustamante S., Mendoza R., Shoocongdej R., Adler L., Baker A., Chintakanon K., Boel C., Tacon P.S.C. Analysis of the Preserved Amino Acid Bias in Peptide Profiles of Iron Age Teeth from a Tropical Environment Enable Sexing of Individuals Using Amelogenin MRM. *Proteomics* 19, 1800341 (2019). <https://doi.org/10.1002/pmic.201800341>.
- Watson J.T. & McClelland J., *Distinguishing Human from Non-Human Animal Bone*. Arizona State Museum, University of Arizona, Tucson (2018).
- Wehmiller J.F. Amino acid studies of the Del Mar, California, midden site: Apparent rate constants, ground temperature models, and chronological implications. *Earth Planet. Sci. Lett.*, 37: 184-196 (1977).
- Welker F., Soressi M., Rendu W., Hublin J.-J., Collins M. Using ZooMS to identify fragmentary bone from the Late Middle/Early Upper Palaeolithic sequence of Les Cottés, France, *Journal of Archaeological Science*, Volume 54, pp. 279-286, ISSN 0305-4403, (2015a) <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.12.010>.
- Welker F., Collins M.J., Thomas J.A., Wadsley M., Brace S., Cappellini E., Turvey S.T., Reguero M., Gelfo J.N., Kramarz A., Burger J., Thomas-Oates J., Ashford D.A., Ashton P.D., Rowsell K., Porter D.M., Kessler B., Fischer R., Baessmann C., Kaspar S., Olsen J.V., Kiley P., Elliott J.A., Kelstrup C.D., Mullin V., Hofreiter M., Willerslev E., Hublin J.J., Orlando L., Barnes I., MacPhee R.D. Ancient proteins resolve the evolutionary history of Darwin's South American ungulates. *Nature*. Jun 4;522(7554):81-4 (2015b). doi: 10.1038/nature14249.
- Welker F., Hajdinjak M., Talamo S., Jaouen K., Dannemann M., David F., Julien M., Meyer M., Kelso J., Barnes I., Brace S., Kamminga P., Fischer R., Kessler B.M., Stewart J.R., Pääbo S., Collins M.J. & Hublin J.-J. Palaeoproteomic evidence identifies archaic hominins associated with the

- Châtelperronian at the Grotte du Renne. PNAS 113 (40), 11162–11167 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1605834113>.
- Welker F., Smith G.M., Hutson J.M., Kindler L., Garcia-Moreno A., Villaluenga A., Turner E., Gaudzinski-Windheuser S. Middle Pleistocene protein sequences from the rhinoceros genus *Stephanorhinus* and the phylogeny of extant and extinct Middle/Late Pleistocene Rhinocerotidae. PeerJ. (2017) Mar 14;5:e3033. doi: 10.7717/peerj.3033.
- Welker, F., Ramos-Madrugal, J., Kuhlwilm, M., Liao, W., Gutenbrunner, P., Manuel, M. De, Samodova, D., Mackie, M., Allentoft, M.E., Bacon, A., Collins, M.J., Cox, J., Lalueza-fox, C., Olsen, J.V., 2019. Enamel proteome shows that Gigantopithecus was an early diverging pongine. Nature 576, 262–265. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1728-8>.
- White T.D. & Folkens, P.A. *Human bone manual*. San Diego, CA : Elsevier Academic Press (2005).
- Wilson L.A., MacLeod N., Humphrey L.T. Morphometric criteria for sexing juvenile human skeletons using the ilium. J. Forensic Sci. 53, 269–278 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00656.x>.
- Wilson J., van Doorn N.L., Collins M. Assessing the extent of bone degradation using glutamine deamidation in collagen. Anal. Chem., 84, 9041 (2012).
- Wilson L.A.B., Ives R., Humphrey, L.T. Quantification of 3D curvature in the iliac crest: Ontogeny and implications for sex determination in juveniles. Am. J. Phys. Anthropol. 162, 255–266 (2017). <https://doi.org/10.1002/ajpa.23114>.
- Yang Y., Shevchenko A., Knaust A., Abuduresule I., Li W., Hu X., Wang C., Shevchenko A., Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. J. Archaeol. Sci. 45, 178–186 (2014).
- Zanchetta G., Giaccio B., Bini M. & Sarti L. Tephrostratigraphy of Grotta del Cavallo, Southern Italy: Insights on the chronology of Middle to Upper Palaeolithic transition in the Mediterranean. Quaternary Sci. Rev., 182: 65-77 (2018).
- Zeder M.A. & Pilaar S.E., Assessing the reliability of criteria used to identify mandibles and mandibular teeth in sheep, *Ovis*, and goats, *Capra*. J. Archaeol. Sci. 37, 225–242 (2010a).
- Zeder M.A. & Lapham H.A., Assessing the reliability of criteria used to identify postcranial bones in sheep, *Ovis*, and goats, *Capra*. J. Archaeol. Sci. 37, 2887–2905 (2010b).

Zilhao J. The emergence of ornaments and art: an archaeological perspective on the origins of “behavioral modernity.”. *J. Archaeol. Res.* 15, 1–54 (2007).

Zilhao J., Banks W.E., d’Errico F., Gioia P., Analysis of site formation and assemblage integrity does not support attribution of the Uluzzian to modern humans at Grotta del Cavallo. *PloS One* 10 (7) e0131181 (2015).

Zilio L., Hammond H., Karampaglidis T., Sanchez-Romero L., Blasco R., Rivals F., Rufà A., Picin A., Chacòn M.G., Demuro M., Examining Neanderthal and carnivore occupations of Teixoneres Cave (Moià, Barcelona, Spain) using archaeostratigraphic and intra-site spatial analysis. *Sci Rep* **11**, 4339 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83741-9>

