



Universitat Rovira i Virgili
Máster en Genética, Física y Química Forense

Trabajo de Fin de Máster

Estimación de temperaturas en restos óseos a través de espectroscopía ATR-FTIR

Belén Izard Arechabala

Tutora académica: Jessica Margalef

Tutora profesional: Isabel Cáceres Cuello de Oro

Facultad de Química URV
Institut de Paleoecologia Humana i Evolució Social

Septiembre 2022



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	4
1.INTRODUCCIÓN	5
1.1. Estructura del tejido óseo	6
1.2. Categorías y grados de cremación de restos óseos	7
2. PROBLEMÁTICA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
3 .MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Material	9
3.2. Protocolo de experimentación tafonómica	9
3.3. Espectroscopía ATR-FTIR	12
3.4. Análisis estadísticos	15
4.RESULTADOS	15
4.1. Resultados físicos	15
4.2. Resultados moleculares: ATR-FTIR	17
4.2.1 Resultados estadísticos	20
5.DISCUSIÓN	25
6.CONCLUSIONES	27
7.PERSPECTIVAS DE FUTURO	28
8.BIBLIOGRAFÍA	28
9. ANEXOS	30

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis dos tutoras, Isabel Cáceres y Jessica Margalef, por aportar sus conocimientos y experiencia.

Asimismo, y debido a que sin él este trabajo ni siquiera existiría quiero agradecer a Héctor del Valle por su aguante, sus enseñanzas y su paciencia. A través de fines de semana y de días de estrés, ha sido él quien me ha ayudado a costa de su propio tiempo; y me ha proporcionado muchas de las ideas que se muestran en este trabajo.

También quiero agradecer a Montserrat Mestres y al Departamento de Química Analítica y Orgánica de la URV en general por haberme cedido la mufla cuando se estropeó la del IPHES. Igualmente, quiero agradecer al coordinador del máster Raúl Beltrán por su duro trabajo.

Por último, pero no por ello menos importante, quisiera agradecer a mi familia y a mi amiga Nuria Puig, cuyo apoyo y cariño me ha mantenido cuerda durante todo el proceso de redacción.

¡Muchas gracias!

RESUMEN

La interpretación de los restos óseos quemados supone un importante desafío tanto para la Antropología forense como para la Arqueología, debido a la alteración de tamaño, forma, aspecto y propiedades físico-químicas de los restos. Ya sea en accidentes, asesinatos u otras escenas forenses que pueden resultar en la presencia de huesos quemados, es necesario desarrollar métodos precisos más allá del aspecto de los restos óseos, ya que pueden llevar a interpretaciones erróneas. En este trabajo se ha realizado una aproximación experimental a los cambios físico-químicos que ocurren cuando se exponen restos óseos a temperaturas comprendidas entre 50°C-1000°C. Se emplearon 13 parámetros a partir de ATR-FTIR que permitieron observar cambios en la fracción orgánica e inorgánica de los restos óseos. La validez de los parámetros se evaluó a través de PCA y LDA. El PCA explicó el 91% de la varianza, mientras que el LDA clasificó correctamente el 80% de los casos originales. Los resultados principales mostraron dificultad en la clasificación de temperaturas entre 100°C-y 400°C, mientras que se obtuvieron clasificaciones del 100% a medida que aumenta la temperatura. Los resultados son compatibles con otras técnicas analíticas como difracción de rayos-X o espectroscopía RAMAN.

ABSTRACT

The interpretation of osseous remains that have been burned is an important challenge concerning both Forensic Anthropology and Archaeology, due to the changes in size, shape, outer appearance and physicochemical properties experimented by such remains. Whether it be an accident, a murder or any other act that can result in burned bones, we must develop accurate methods that dwell in more than just the outer appearance of these osseous remains, as such characteristics may lead to wrong interpretations. In this study, we have conducted an experimental approximation to the physicochemical changes that take place when osseous remains are exposed to temperatures between 50°C-1000°C. We used 13 parameters measured by the ATR-FTIR that allowed us to observed changes in both the organic and inorganic fraction of osseous remains. Furthermore, we used a PCA and a LDA to study the validity these parameters. The PCA explained 91% of the variance, while the LDA correctly classified 80% of the original samples. The main results were less accurate in the classification of temperatures between 100°C and 400°C, whilst the were 100% accurate as the temperature raised. These results are compatible with other analytical techniques such as x-ray diffraction or RAMAN spectroscopy.

1.INTRODUCCIÓN

El análisis de huesos humanos quemados es de gran interés para los antropólogos forenses y arqueólogos debido a los problemas asociados a su descubrimiento, identificación y clasificación (Cascañt et al.; 2017).

La Tafonomía es la disciplina que se encarga de todos los procesos que ocurren en una acumulación de restos, entendida como el momento de deposición de un organismo o un conjunto de organismos desde el momento de la muerte hasta que se registra (Efremov, 1940). De manera general, se asume que la disciplina se subdivide en dos áreas. Por un lado, la Bioestratinomía, que se refiere a todos aquellos procesos que ocurren antes de la sedimentación y enterramiento de los restos. Y, por otro lado, la Fossildiagénesis que se refiere a todos aquellos procesos, principalmente físico-químicos, que se dan tras la sedimentación y enterramiento de los restos. Un tercer término es empleado en la bibliografía forense, la fase necrológica. En este término se enmarcan los procesos iniciales de putrefacción y descomposición previos a la desarticulación, límite en el que comenzaría la fase bioestratinómica.

La Tafonomía forense, entendida como el cuerpo de conocimiento tafonómico aplicado a la resolución de casos forenses, se dedica al estudio de todas las modificaciones *post mortem* que tienen lugar en los restos humanos desde su deposición hasta que son recuperados, dando información sobre todas las modificaciones ocurridas sobre un individuo o un conjunto dado.

Uno de los procesos a los que se enfrenta tanto la tafonomía arqueológica como la forense es la problemática de las cremaciones y modificaciones por exposición a temperatura (Shipman et al., 1984; Steiner et al., 1995; Cáceres, 2002; Lebon et al., 2010; Thompson, 2013; Ellingham et al., 2016, *inter alia*). A menudo en escenas forenses se recuperan huesos humanos expuestos a temperaturas que dificultan la identificación de los restos óseos y la extracción de biomoléculas como ADN o proteínas. Algunos ejemplos pueden ser los ataques terroristas del 11 de septiembre, los incendios forestales, accidentes aéreos o la identificación de víctimas de la Guerra civil española. Del mismo modo, en contextos arqueológicos pueden darse cremaciones durante la acción de cocinar, el uso de restos óseos como combustible o en tratamientos funerarios. Tradicionalmente los restos óseos expuestos a temperatura pueden identificarse a través de sus coloraciones (ver apartado 1.4). Sin embargo, la coloración puede verse alterada por otros procesos tafonómicos, por lo que es importante establecer métodos de análisis físico-químicos que permitan establecer la temperatura a la que los restos óseos se

exponen. En este trabajo presentamos una metodología a través de espectroscopía ATR-FTIR. Esta técnica nos permite analizar tanto la parte orgánica como inorgánica de los restos óseos, requiere de poca cantidad de muestra y permite obtener resultados reproducibles y comparables. Además, es una técnica complementaria con otras técnicas como Difracción de rayos X y espectroscopía RAMAN.

Así, el análisis de las muestras óseas mediante las técnicas adecuadas nos puede aportar mucha información en escenas arqueológicas y forenses, como puede ser la presencia o no de acelerantes y la temperatura de exposición de los restos óseos, lo cual, a su vez nos permite conocer el entorno y las circunstancias de la cremación. No obstante, es necesario conocer el tejido óseo y sus componentes antes de entrar en las modificaciones generadas por la exposición a temperaturas.

1.1. Estructura del tejido óseo

A nivel macroestructural, el hueso es un tejido que se compone de diferentes capas (periostio, hueso cortical y endostio) y pueden existir distintos tipos de huesos (planos, largos, compactos o esponjoso). A nivel nanoestructural, el hueso está compuesto por una matriz orgánica (en una proporción del 25% de lo que es mayoritariamente colágeno de tipo 1), agua (10%) y un componente inorgánico (65%). La fracción inorgánica está constituida por nanocristales de bioapatita, $\text{Ca}_{10-x}[(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x](\text{OH})_2$, una forma no estequiométrica de hidroxiapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, en la que diversos elementos entran en la estructura en cantidades menores y trazas produciendo sustituciones iónicas como CO_3^{2-} , Na^{2+} o F^- en su medio fisiológico. Estas sustituciones permiten que los cristales se mantengan en un tamaño de 25nm x 2-4nm (Pasteris et al., 2014, Reidsma et al., 2016).

Por otro lado, la fracción orgánica del hueso se compone en un 90% de colágeno de tipo I, con una cadena triple y elíptica que forma una estructura flexible y ligeramente elástica conferirá a los huesos sus características de elasticidad y flexibilidad. El 10 % restante de la fracción orgánica resulta en proteínas no colágenas, proteoglicanos, osteocalcina, glicoproteínas y lípidos (8%), que se encargan de la correcta formación de los tejidos; y células óseas (2%) como pueden ser células osteoprogenitoras, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos (Lebon et al., 2010; Del Valle., 2021).

1.2. Categorías y grados de cremación de restos óseos

Las cremaciones y modificaciones térmicas de los restos óseos pueden clasificarse a partir de su aspecto macroscópico. Por ejemplo, según Ellingham et al. (2015), los huesos quemados pueden ser normalmente clasificados en tres categorías:

- Huesos carbonizados: Han sido directamente expuestos al fuego y tienen una apariencia negra debido a la carbonización tanto de la materia esquelética como del tejido blando.
- Huesos calcinados o incinerados: Han sido tan alterados que toda la materia orgánica y el agua contenida en el hueso se han perdido. Este tipo de huesos normalmente se encuentran deformados y fracturados, con una apariencia blanquecina.
- Restos quemados o ‘cremains’: Resultado de los restos esqueléticos calcinados y otras partículas que se producen tras la incineración humana. Mediante un aplastamiento mecánico se pueden obtener las cenizas de estos huesos.

Estas categorías responden básicamente a dos variables: la intensidad del fuego y el tiempo expuesto al mismo. De acuerdo con Marques et al (2018) y Ellingham et al (2016), el proceso de cremación se desarrolla de la siguiente manera:

1. Deshidratación: Se produce la rotura de los enlaces hidroxilos y la evaporación de las moléculas de agua de la materia orgánica y aquellas adheridas a los cristales de hidroxiapatita. La temperatura en estos casos es de entre 25 y 250°C.
2. Descomposición de los componentes orgánicos, que ocurre en un intervalo de temperatura de entre 400°C y 500°C
3. Inversión: Pérdida de carbonato por el aumento de temperatura, desapareciendo por completo a los 700°C.
4. Fusión: Cambios en la cristalinidad que vienen acompañados por un aumento del tamaño del cristal. También se produce el reordenamiento de PO₄ y OH en los poros dejados tanto por el agua como por los componentes orgánicos. El proceso se completa una vez llegamos a los 1000°C.

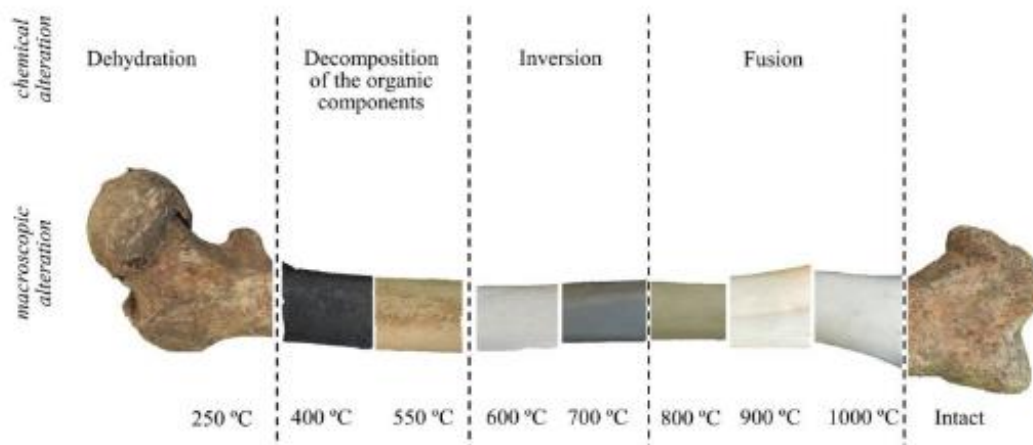


Figura 1: Cambios de color y etapas que se producen en el hueso debido al aumento de temperatura (Extraído de Marques et al., 2018).

Por otra parte, el hueso carbonizado (sin oxígeno presente) sufrirá alteraciones diferentes al hueso combustionado (con oxígeno presente), por lo que también debemos tener en cuenta el tipo de fuego al que se ha visto sometido el hueso antes de decidir la técnica analítica que vamos a utilizar.

Básicamente, el fuego se produce por la combinación de tres componentes: una fuente de calor externa, un comburente (oxígeno) y un combustible, siendo este último el que aporta la energía que luego se transformará en calor.

Cuando la temperatura del fuego se acerca a los 300°C, se producen reacciones químicas que van lentamente cambiando los constituyentes originales de estos materiales orgánicos. Esta etapa requiere de calor, pero no de oxígeno, y se forman compuestos aromáticos que serán liberados en forma de gases volátiles. Esta carbonización inicial es necesaria para que se produzca la combustión posterior, manteniendo la temperatura superior a 300°C, suficiente para que se produzca la oxidación.

Cuando la oxidación se completa, toda la materia orgánica habrá desaparecido. En el momento en el que todo el oxígeno haya sido consumido, manteniendo altas temperaturas, la estructura molecular cambiará, formándose láminas planas de moléculas poliaromáticas y se producirá un ordenamiento del material carbonizado y un aumento de la cristalización (Reidsma et al.; 2016).

2. PROBLEMÁTICA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es determinar las modificaciones tafonómicas que ocurren cuando los restos óseos son expuestos a una temperatura y tiempo conocidos. Con este fin, se ha utilizado la técnica FTIR debido a que, como hemos señalado anteriormente, nos permite observar cambios en la parte orgánica e inorgánica. Por ello y para llevar a cabo este objetivo principal ha sido necesario:

- Diseñar un protocolo de experimentación que recoja un gradiente de temperaturas de entre 50°C y 1000°C
- Procesar los espectros de infrarrojos a través de áreas y picos
- Evaluar estadísticamente los resultados obtenidos a través de análisis de componentes principales (PCA) y Análisis discriminante lineal (LDA).

Además, se ha atendido a las coloraciones que se obtienen de los restos para complementar los análisis macroscópicos de restos quemados. Conociendo como el color se relaciona con el estado químico del hueso, permitirá comprender a partir de qué temperatura pueden realizarse análisis de extracción de ADN o proteínas.

3 .MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material

Para realizar este trabajo se utilizaron 4 fémures de cerdo (*Sus scrofa domestica*) subadultos, de los cuales se obtuvieron un total de 60 muestras de las diáfisis (ver tabla 1). Las epífisis fueron desechadas debido a su mayor porosidad y alto contenido en lípidos. De las 60 muestras, 56 fueron quemadas y 4 corresponden a muestras de control.

3.2. Protocolo de experimentación tafonómica

En primer lugar, se eliminaron los tejidos blandos de las muestras. Posteriormente, se fragmentaron los 4 fémures obteniendo 60 muestras. Las muestras se distribuyeron de 50°C a 1000°C exponiéndolas de 30 minutos a 2 horas tal y como se muestra en la tabla 1. Todas las muestras fueron pesadas antes y después de la cremación con una balanza de precisión.

Se utilizó una Mufla capaz de alcanzar las temperaturas deseadas (de 50°C a 1000°C) y se procedió a la cremación de las muestras, extrayéndolas en intervalos de 30 minutos (ver Tabla 1).

	30 minutos	1 hora	90 minutos	2 horas
50 °C	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8
100 °C	Muestra 9	Muestra 10	Muestra 11	Muestra 12
150 °C	Muestra 13	Muestra 14	Muestra 15	Muestra 16
200 °C	Muestra 17	Muestra 18	Muestra 19	Muestra 20
250 °C	Muestra 21	Muestra 22	Muestra 23	Muestra 24
300 °C	Muestra 25	Muestra 26	Muestra 27	Muestra 28
350 °C	Muestra 29	Muestra 30	Muestra 31	Muestra 32
400 °C	Muestra 33	Muestra 34	Muestra 35	Muestra 36
500 °C	Muestra 37	Muestra 38	Muestra 39	Muestra 40
600 °C	Muestra 41	Muestra 42	Muestra 43	Muestra 44
700 °C	Muestra 45	Muestra 46	Muestra 47	Muestra 48
800 °C	Muestra 49	Muestra 50	Muestra 51	Muestra 52
900 °C	Muestra 53	Muestra 54	Muestra 55	Muestra 56

1000 °C	Muestra 57	Muestra 58	Muestra 59	Muestra 60
Muestras control	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4

Tabla 1: Numeración y tiempo de las muestras empleadas en el experimento tafonómico.

Atendiendo a los cambios macroscópicos creó un gradiente de colores entre las muestras que iba desde el marfil (hueso no quemado) hasta el blanco puro (hueso calcinado).



Figura 2: Cambios físicos y colorimétricos de los huesos cuando aumenta la temperatura. Imagen extraída de Cáceres (2002).

Según Cáceres (2002), este gradiente responde a una degradación de la materia orgánica que puede organizarse en cinco grados de coloración (Fig. 2):

- Grado 1: Huesos sin quemar con áreas marrones.
- Grado 2: El hueso se vuelve marrón, debido a la presencia de hemoglobina, pero todavía se encuentra intacto sin agrietar.
- Grado 3: Los huesos empiezan a carbonizarse y adquieren un color negro que se relaciona con la pérdida de oxígeno.
- Grado 4: Los huesos adquieren un color grisáceo oscuro con una superficie muy agrietada. Se produce la disminución del tamaño total del hueso y, la superficie del hueso adquiere un aspecto brillante.

- Grado 5: Huesos calcinado, se adquiere una coloración blanca. El hueso sufre una descomposición de los componentes orgánicos (pirólisis) y se produce la exfoliación del hueso, pudiendo llegar a pulverizarse.

3.3. Espectroscopía ATR-FTIR

En los últimos años se ha observado un aumento en la utilización del FTIR en los estudios arqueológicos y forenses debido, entre otros, a su poder de discriminación entre huesos modernos o fosilizados, y por su capacidad para estimar el intervalo *post-mortem* en el campo de las ciencias forenses, lo cual se consigue analizando el grado de cristalinidad del hueso y la cantidad de carbonato y colágeno que contiene (Marques et al., 2018).

En nuestro trabajo, la espectroscopía de infrarrojos ATR-FTIR se utilizó para observar los cambios que se producen en las muestras óseas a medida que aumenta la temperatura y el tiempo de exposición. Para ello, se eligieron trece parámetros (ver Tabla 2) que nos permitieron conocer los cambios que se producen en la materia orgánica y el grado de recristalización de los cristales de bioapatita y la aparición o desaparición de otros componentes como carbonatos o lípidos. (Reidsma et al., 2016).

Las muestras fueron pulverizadas manualmente con un mortero de ágata en los laboratorios de la Facultad de Química de la URV y laboratorios del IPHES, poniendo especial cuidado en la limpieza de superficies y partes blandas (donde podrían acumularse los lípidos) con una cuchilla. Posteriormente se tamizaron para obtener un tamaño de partícula comprendido entre 50 μ m y 20 μ m siguiendo el protocolo expuesto en Kontopoulos et al., 2018.

Tradicionalmente, en el análisis de polvo de hueso se ha utilizado el uso de pastillas de KBR frente al uso de ATR-FTIR. Sin embargo, en este trabajo se ha optado por utilizar ATR-FTIR frente a FTIR en modo de transmisión con pastillas de KBR debido a que permite obtener resultados reproducibles, comparables con una mínima cantidad de muestra. Además, al acoplarlo con ATR, se minimiza la cantidad de muestra preparada, disminuye el impacto del ruido de fondo y mejora la comparación de diferentes muestras. Por ello, la espectrometría FTIR es una técnica conveniente y relativamente barata para la caracterización del material y la exploración de su estructura molecular en restos óseos (Leskovar et al. 2020). Por otra parte, también debemos tener en cuenta las desventajas como, por ejemplo, saber que la caracterización de la estructura molecular de los restos esqueléticos puede ser elusiva, debido a que sus propiedades fisicoquímicas son complejas y heterogéneas. Por ello, se complementa

el análisis de FTIR comparando las alturas entre los picos o sus áreas, lo que añade un paso extra y prolonga el tiempo de análisis. Este análisis posterior puede llevar a errores y limita la información que se puede obtener y la comparabilidad entre los resultados (Leskovar et al., 2020). Debemos tener en cuenta que no todas las muestras van a ser completamente idénticas y van a existir, por tanto, variaciones entre unas y otras. Según Ellingham y colaboradores (2016) normalmente las causas de estas variaciones pueden ser la presencia de grasa, la posición del hueso con respecto a la fuente de calor, diferencias en el tipo de tejido óseo, presencia de ropa (en el caso de víctimas de incendios).

El análisis se realizó en un rango medio del espectro de luz infrarroja de entre 400 y 4000 cm^{-1} . Normalmente, los componentes orgánicos se encuentran entre 1200-1800 cm^{-1} , lo que nos permitirá observar cambios en la estructura del colágeno. Los espectros se normalizaron a 0,5 abs para el pico principal de los fosfatos $\nu_3(\text{PO}_4)$ (Lebon et al., 2016). Posteriormente se establecieron las líneas base para el cálculo de parámetros (ver Tabla 2). Los espectros se obtuvieron con un espectrómetro Jasco FT/IR-6800 disponible en el Servei de Recursos Científics i Tècnics de la URV (Tarragona) a una resolució de 2 cm^{-1} con 64 scans en el rango de 4000-400 cm^{-1} , realizando 3 espectros por cada muestra. Los espectros se analizaron con el programa Spectra ManagerTM 2.15.00 (JASCO).

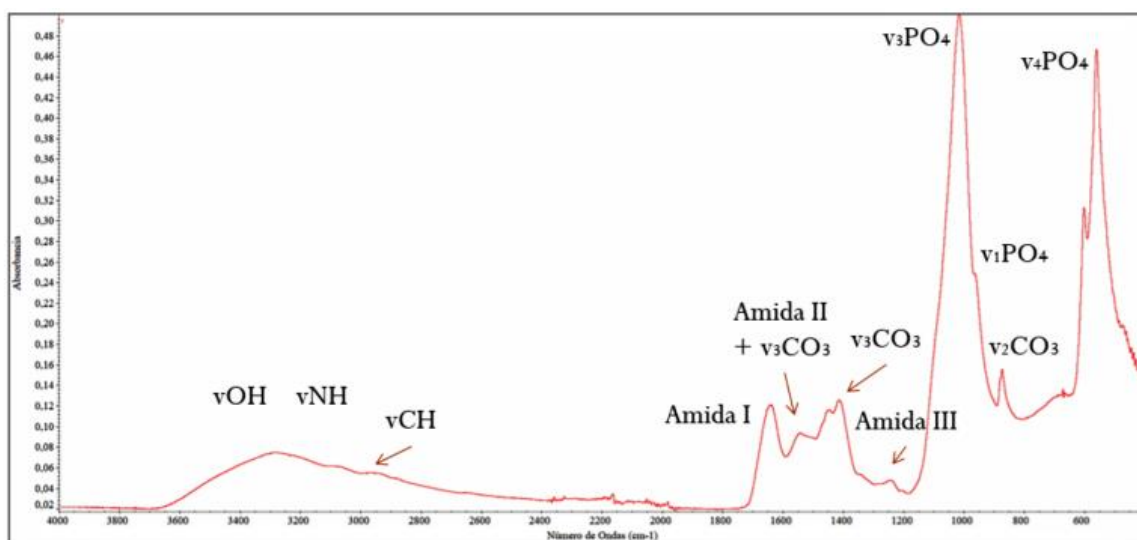


Figura 3: Diagrama donde se muestran el número de onda de las principales regiones que vamos a estudiar. Imagen: Del Valle, H. (2021)

	Parámetro	Picos	Definición	Línea base	Referencia
fosfatos	FWHM	1010 cm ⁻¹	Anchura a media altura para $\nu_3(\text{PO}_4)$	1150 cm ⁻¹ - 890 cm ⁻¹	(Kimura-Suda and Ito 2017) (Hollund 2013)
	IRSF	(560 cm ⁻¹ + 600 cm ⁻¹) / 590 cm ⁻¹	Indicador del orden y tamaño de la red cristalina	640/420 cm ⁻¹ 750/420 cm ⁻¹ (Si hay hidróxidos)	(Weiner and Bar-Yosef 1990)
carbonatos	C/P	1415 cm ⁻¹ / 1010 cm ⁻¹	Carbonatos respecto a fosfatos	1590 cm ⁻¹ - 1290 cm ⁻¹	(Wright and Schwarcz 1996) (Sponheimer and Lee-Thorp 1999)
	BPI	1410 cm ⁻¹ / 600 cm ⁻¹	Proporción relativa de carbonato tipo B	1590 cm ⁻¹ - 1290 cm ⁻¹	(Snoeck et al. 2014) (Sponheimer and Lee-Thorp 1999)
	API	1540 cm ⁻¹ / 600 cm ⁻¹	Proporción relativa de carbonato tipo A	1200 cm ⁻¹ - 1800 cm ⁻¹	(Sponheimer and Lee-Thorp 1999)
	(CO ₃)/PO ₄	872/1010 cm ⁻¹	Carbonatos con respecto a fosfatos	830-890 cm ⁻¹	Thompson et al., 2013 Ellingham et al., 2016
	C/C	1455 cm ⁻¹ / 1410 cm ⁻¹	Relación entre carbonatos A y B	1200 cm ⁻¹ - 1800 cm ⁻¹	(Thompson et al. 2009)
Proteínas	AmI/C ₁	1640 cm ⁻¹ / 600 cm ⁻¹	Amida I respecto a carbonatos B	1710 cm ⁻¹ - 1590 cm ⁻¹ 1150 cm ⁻¹ - 890 cm ⁻¹	(Kontopoulos et al. 2020)
	AmIII/P	1240 cm ⁻¹ / 1010 cm ⁻¹	Amida III (α hélices) respecto a fosfatos	1290 cm ⁻¹ - 1210 cm ⁻¹	(Chadefaux et al. 2009) (Leskovar et al. 2020)
	Am/P	1640 cm ⁻¹ / 1010 cm ⁻¹	Relación entre amida I y fosfatos	1710 cm ⁻¹ 1590 cm ⁻¹ 1150 cm ⁻¹ - 890 cm ⁻¹	(Trueman et al. 2004) (Lebon et al. 2016)
Grupos OH ⁻	3752/603	3752 cm ⁻¹ / 603 cm ⁻¹	Hidróxidos respecto a fosfatos	3560 cm ⁻¹ - 3580 cm ⁻¹	(Mamede et al, 2018)
	3752/1035	3752 cm ⁻¹ / 1035 cm ⁻¹	Hidróxidos respecto a fosfatos	3560 cm ⁻¹ - 3580 cm ⁻¹	(Mamede et al, 2018)
	PHT	630 cm ⁻¹ / 600 cm ⁻¹	Hidróxidos respecto a fosfatos	750 cm ⁻¹ - 420 cm ⁻¹	(Thompson et al., 2013) (Ellingham et al., 2016)

Tabla 2: Resumen de los índices estudiados, las bandas donde podemos encontrarlas, su significado y las líneas base utilizadas.

3.4. Análisis estadísticos

El tratamiento de datos se realizó en primer lugar, con una visualización de los parámetros por temperaturas a través de diagramas de cajas (*boxplot*), extraídos a partir de los espectros normalizados.

Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el software MATLAB y siguiendo las recomendaciones de Thompson y colaboradores (2013), de modo que se puede visualizar de forma sencilla la distribución de los datos en el espacio de componentes principales y qué parámetros tienen más importancia en dicha distribución.

Finalmente, se realizó un análisis discriminante lineal (LDA) para discriminar las temperaturas a las que los huesos se expusieron a partir de los parámetros utilizados a través de ATR-FTIR. Se obtuvo una tabla de crosvalidación en la que se evalúa el porcentaje de asociación que el test realiza a conociendo la temperatura a la que se expusieron las muestras. El LDA se realizó utilizando el lenguaje de programación R 1.1.453. Posteriormente, se utilizó la base de datos (*training data*) para evaluar dos muestras quemadas en contextos no controlados:

- 1) Resto óseo calcinado entre 650 y 700°C en una hoguera al aire libre controlando la temperatura a través de una sonda térmica.
- 2) Resto óseo cocinado a 180°C durante 1 hora en horno doméstico

4.RESULTADOS

4.1. Resultados físicos

Los resultados obtenidos concuerdan con los proporcionados por Cáceres (2002), es decir, se han podido observar los diferentes grados de coloración. Sin embargo, al tener en cuenta no sólo el efecto de la temperatura, sino también el tiempo de exposición al fuego, el gradiente es menos intuitivo ya que, dentro de las muestras sometidas a la misma temperatura, aquellas que hayan tenido un tiempo de exposición mayor, pueden exhibir colores que pertenecen a las siguientes temperaturas.

Así, podemos estudiar de forma macroscópica los cambios de coloración del hueso (ver Fig. 4):

- Hasta los 200°C podemos observar un hueso pulcro, sin demasiadas grietas y con coloración marrón clara.
- A partir de los 250°C y hasta los 400°C, la coloración pasa de marrón a negro. La superficie del hueso es a menudo brillante y ya se encuentran cenizas en la muestra resultante. Es también en esta etapa cuando se empiezan a observar las primeras grietas.
- A partir de 450°C, el hueso se vuelve negro, las grietas empiezan a extenderse y son más profundas que en las muestras de las anteriores, por lo que el hueso es más frágil y las cenizas son abundantes.
- Entre los 600°C y los 700°C y hasta los 1000°C se obtiene una coloración blanca y una superficie perlada. Una peculiaridad de este tipo de muestras es la aparición de bordes rosas una vez llegamos a 900°C. En esta etapa los huesos son extremadamente frágiles y se pulverizan con mucha facilidad.

Con independencia del color, existen otras propiedades físicas también importantes como puede ser la disminución de peso de la muestra, causada por la pérdida de agua. Esta disminución es más o menos estable a lo largo de las muestras, pero resulta más obvia cuanto mayor sea el tiempo de exposición y más extrema sobre los 500°C, coincidiendo con la pérdida de materia orgánica.

4.2. Resultados moleculares: ATR-FTIR

Los resultados de los espectros y los principales parámetros se encuentran expuestos en las figuras 4 y 5 y en los apartados de anexos 1 y 2.

En primer lugar, el índice de cristalinidad o IRSF aumentan de acuerdo al incremento de temperatura alcanzando sus máximos a 600°C (6.26) y cayendo nuevamente si seguimos aumentando la temperatura a partir de los 800°C. Los valores mínimos, por otra parte, se obtienen a 50°C (2.89).

Por otra parte, el FWHM de la banda $\nu_3\text{PO}_4$ exhibe un diagrama normal, con los valores generales decayendo a medida que aumenta la temperatura hasta los 700°C, momento en el que encuentra su valle y luego procede a aumentar de nuevo. Así tenemos un máximo a 100°C (116,87) y un mínimo a los referidos 700°C (50,05).

Para los índices C/P, se observa el *boxplot* esperado, ya que los carbonatos disminuyen con respecto a la temperatura, mientras que los fosfatos aumentan, y por tanto la disminución de valores es casi logarítmica, teniendo los valores mayores a menores temperaturas (en este caso a 100 °C, el valor es de 0,376) y viceversa (a 1000°C el valor es de 0,0054).

Para el BPI o índice que mide la proporción de carbonatos B, la disminución es también notoria, teniendo un máximo a 100 °C (0,7822) y un mínimo a 1000°C (0,0106). Por otro lado, el API, índice que mide la proporción de carbonatos A, tiene también su máximo a temperaturas bajas, pero en este caso son las muestras sin quemar las que tienen valores más grandes, seguidas por las muestras quemadas a 50°C. El mínimo se sitúa en este caso a 700°C (0,047)

Así, el índice que compara la proporción de carbonatos tipo A (aquellos que sustituyen a los grupos OH en la red cristalina) con respecto a los carbonatos B (aquellos que sustituyen a los PO_4 en la red cristalina), es decir, el índice C/C, aumenta conforme aumenta la temperatura, teniendo su máximo a 1000°C (3,62) y su mínimo a 250°C (0,789). Gracias a este índice podremos saber el estado de la bioapatita, ya que los carbonatos en las posiciones B son dominantes dentro de ella (Madupalli et al. 2017).

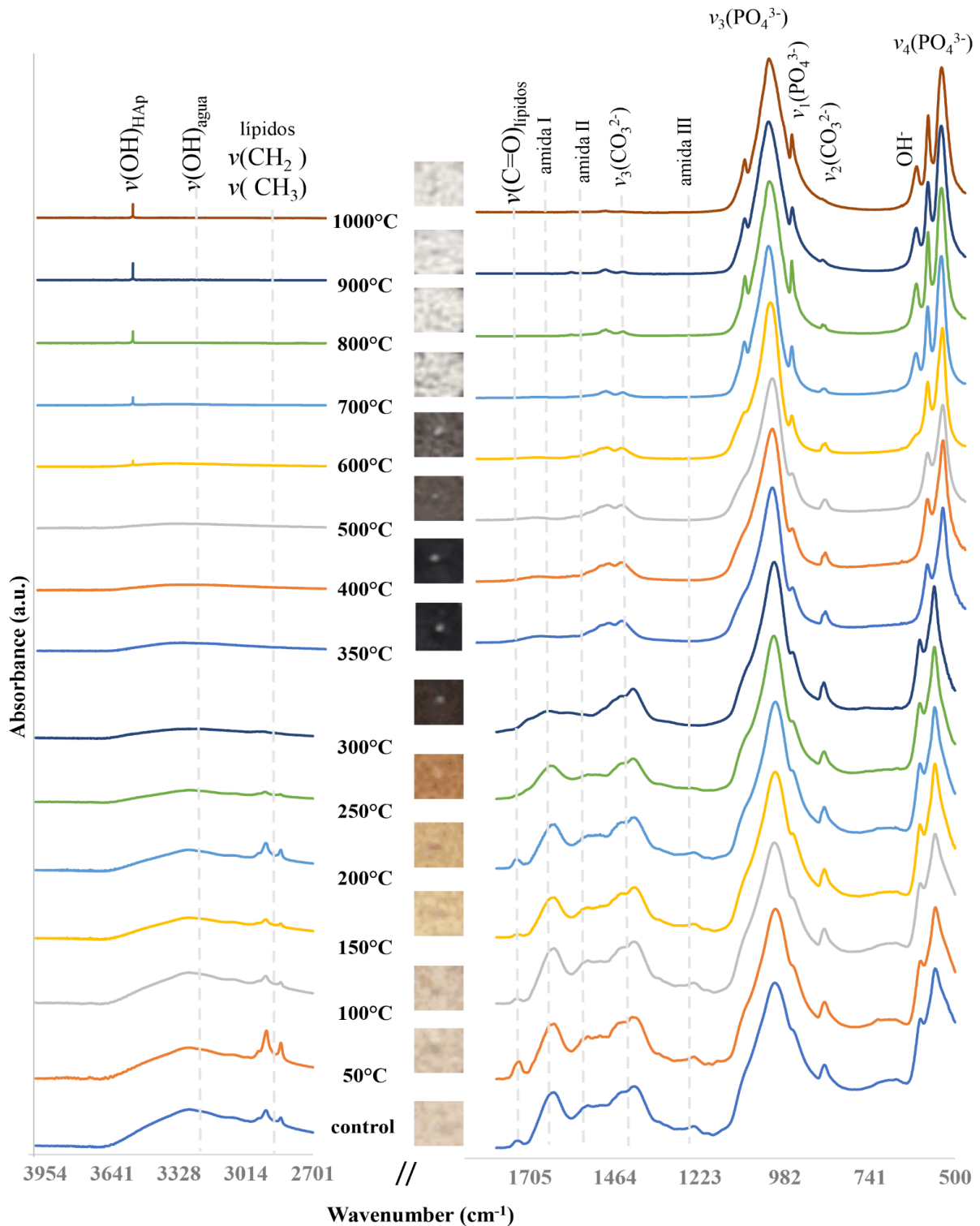


Figura 4: Cambios colorimétricos relacionados con los espectros proporcionados por el FTIR de acuerdo a la longitud de onda donde aparecen las distintas biomoléculas (Figura elaborada por Héctor del Valle).

Por último, en relación a los carbonatos tenemos el índice CO_3/PO_4 , que disminuye de acuerdo aumenta la temperatura, siendo el máximo a 100°C (0.191) y el mínimo a 1000°C (0.002).

En cuanto a los hidróxidos, como ya hemos dicho antes solo aparecen a partir de los 700°C, por lo que es un índice adecuado para la diferenciación en huesos calcinados debido a que su coloración siempre es blanca. En general, las muestras a 700°C presentan una gran variabilidad, que se va corrigiendo conforme aumenta la temperatura.

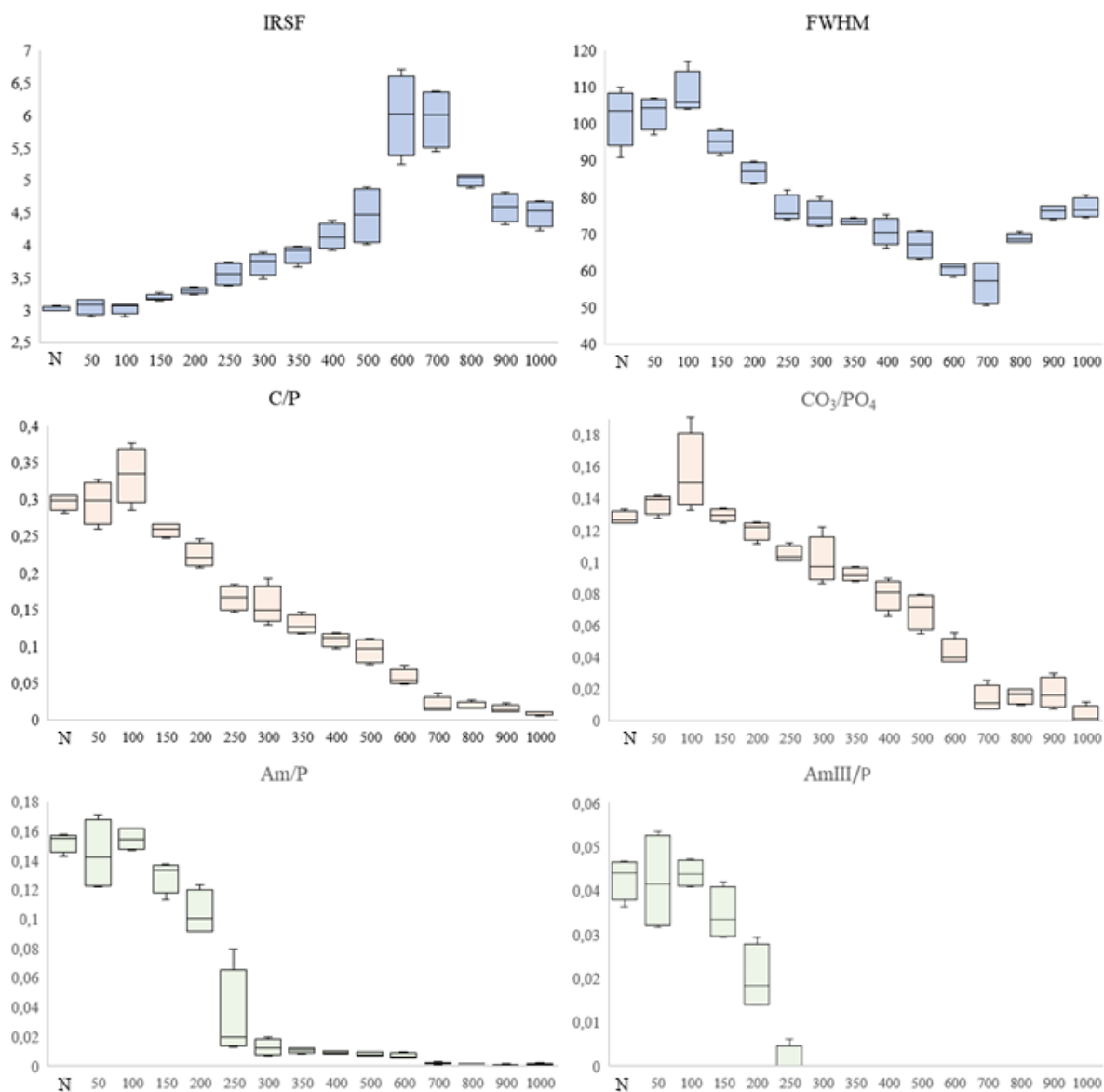
Así, tenemos el índice 3572/1035 donde el máximo se encuentra a 800°C (0.01469) y el mínimo en cambio a 900°C (0.00708). Esta tendencia también es seguida por el siguiente índice (3572/603), ya que parece que la proporción de hidróxidos va aumentando conforme aumenta la temperatura y luego experimenta un gran valle a los 900°C (0,01304). En este caso el valor máximo se obtuvo a 700°C (0.02922).

El último índice de los hidróxidos es el PHT (Phosphate High Temperature) . En este podemos observar una gran variabilidad de todas las muestras en general, a excepción de las de 800°C. Esto es más notable a los 700°C ya que presenta ambos valores extremos (tanto máximos como mínimos) para este índice (0,01399 y 0,00843, respectivamente).

En cuanto a las amidas tenemos tres parámetros a medir. La Am/P presenta igualmente una curva logarítmica, ya que mientras que las aminos disminuyen según aumenta la temperatura, los fosfatos como ya hemos visto, no hacen más que aumentar y de ahí que los valores máximos para este índice se encuentren a 50°C (0,1707) y los mínimos a 900°C (0,00024). A partir de este índice podemos calcular también el porcentaje de colágeno de los huesos, que evidentemente disminuye conforme aumenta la temperatura y se pierde la materia orgánica, pasando de un 20% a 50°C, a un 1.72% a los 1000°C.

El índice AmI/C₁, presenta una curva insólita, debido a la gran disminución que se observa a los 250 °C (Pasa de valores de 0.68039 a valores de 0.11011). En conjunto, el valor máximo se alcanza a 100°C (0.95249) mientras que el valor mínimo se encuentra a 900°C (0.03903), pero la diferencia entre estos dos valores es notable.

Como último índice a estudiar tenemos el AmIII/P, que atiende a la amida III relacionada con el contenido de colágeno tipo I siendo la banda más sensible. Se registra hasta que se alcanzan los 250°C. El valor máximo se encuentra a los 50°C (0.05357) y el mínimo a los 250°C (0.00617),



Figuras 5: Se muestran los *boxplot* de algunos de los principales parámetros estudiados. En azul, parámetros relativos a los fosfatos; en naranja, parámetros relativos a los carbonatos; en verde, parámetros relativos al colágeno.

4.2.1 Resultados estadísticos

El análisis de componentes principales o PCA, nos permite sacar conclusiones acerca de la fuerza de las relaciones entre los distintos parámetros, y determinar cuáles son los parámetros que mejor explican los cambios producidos por la temperatura en nuestras muestras óseas (Thompson et al., 2013).

Utilizando el programa Matlab se realizó un PCA (ver figuras 6 y 7) para estudiar la distribución de las muestras en el espacio de componentes. En general, se consiguió explicar el 91% de la varianza a partir de dos componentes (75% para el primero y 16% para el segundo).

Componente	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13
Varianza	75.62	16.87	3.66	2.33	0.61	0.33	0.26	0.15	0.12	0.025	0.012	0.007	0.005

Tabla 3: Representación numérica de la varianza absoluta de los distintos componentes principales (PC).

Observando los gráficos (Fig. 6 y Fig. 7), podemos observar un desplazamiento de las muestras según aumenta la temperatura. Hasta los 250°C, es decir, en las bajas temperaturas observamos que los parámetros que mejor explican su distribución son FWHM y AMIII/P. A medida que aumentamos la temperatura, el parámetro principal pasa a ser CO_3PO_4 , y hacia los 300°C, es el índice de cristalinidad (IRSF) el que permite distribuir las muestras en el espacio de los componentes.

Finalmente, llegando a los 700°C (recordemos que en este punto la mayoría de la materia orgánica ha desaparecido y empiezan a aparecer los grupos OH^-), los parámetros principales pasan a ser los parámetros relativos a grupos OH (3752/603, 3752/1035 y PHT) y a la relación de carbonatos tipo A y B (C/C).

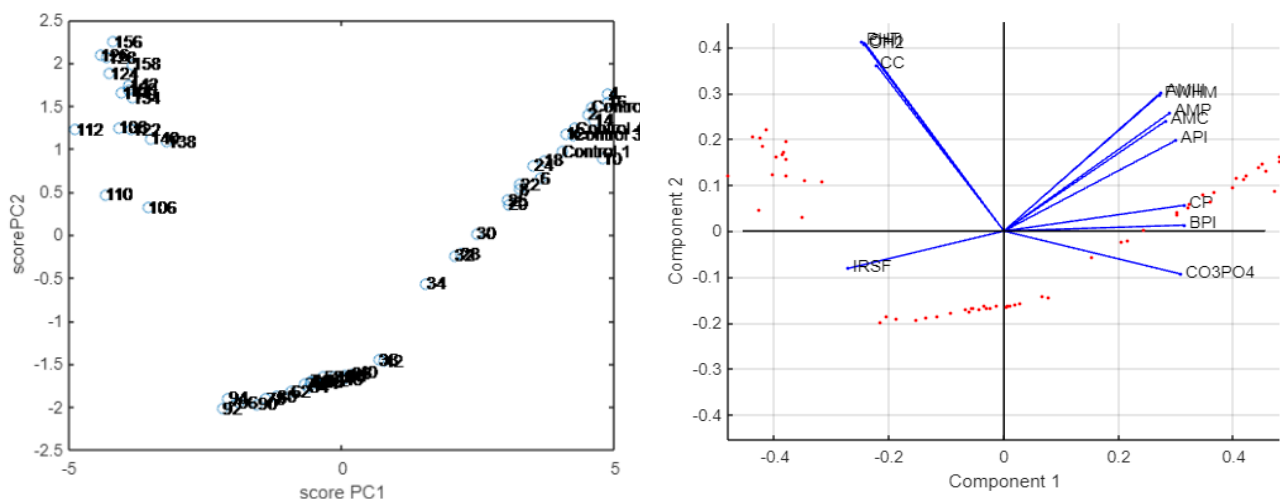


Fig 6 y Fig. 7: Gráficos proporcionados por el análisis de componentes principales

En cuanto al LDA permitió la clasificación correcta (Tabla 4; Fig.8) en un 80% de los casos originales. En este aspecto, las temperaturas con un porcentaje de asociación altas (casi 100%) se encuentran a partir de los 500°C. Del mismo modo, los restos no quemados han obtenido un porcentaje de asociación cercano a 100%. Entre los 50 °C y los 500°C el porcentaje de asociación es menor en la mayoría de los casos, llegando incluso a equivocarse en el grupo al que pertenecen (Tabla 4).

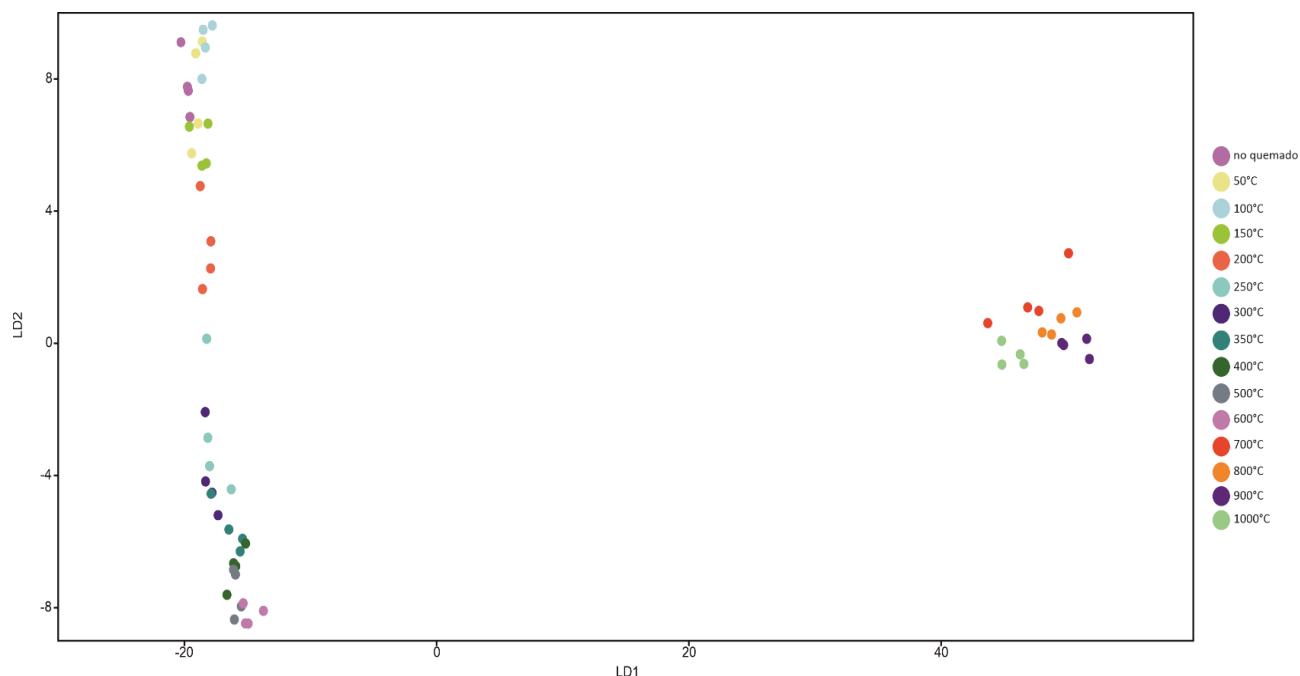


Figura 8: Análisis discriminante lineal que representa las muestras óseas ordenadas por temperaturas

muestra	real (°C)	CV (°C)	N	50	100	150	200	250	300	350	400	500	600	700	800	900	1000
1	N	N	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	N	N	0,999	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	N	N	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	N	N	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	50	50	0,000	0,976	0,024	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	50	100	0,001	0,336	0,663	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	50	50	0,000	0,870	0,013	0,117	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	50	150	0,000	0,047	0,000	0,953	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
9	100	100	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	100	50	0,000	0,927	0,019	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
11	100	100	0,001	0,021	0,978	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	100	100	0,000	0,003	0,997	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
13	150	150	0,002	0,061	0,001	0,936	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
14	150	150	0,000	0,002	0,000	0,998	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	150	150	0,000	0,000	0,000	0,868	0,131	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
16	150	150	0,000	0,014	0,000	0,986	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

17	200	200	0,000	0,000	0,000	0,459	0,541	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	200	200	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
19	200	200	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	200	200	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
21	250	200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,867	0,133	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
22	250	250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,830	0,170	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
23	250	250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,829	0,171	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	250	300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,127	0,873	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25	300	300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,169	0,831	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
26	300	300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,994	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
27	300	300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,997	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
28	300	300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,699	0,287	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
29	350	300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,983	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
30	350	350	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,849	0,148	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
31	350	400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,383	0,594	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
32	350	350	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,530	0,459	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
33	400	400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,477	0,515	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
34	400	400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,140	0,764	0,097	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
35	400	500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,151	0,848	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
36	400	400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,114	0,653	0,233	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
37	500	400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,076	0,771	0,153	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
38	500	400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042	0,668	0,290	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
39	500	500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,992	0,000	0,000	0,000	0,000
40	500	500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038	0,962	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
41	600	500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,991	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
42	600	600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
43	600	600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
44	600	600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
45	700	700	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
46	700	700	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
47	700	700	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
48	700	700	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
49	800	800	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
50	800	800	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
51	800	800	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
52	800	800	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
53	900	900	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
54	900	900	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
55	900	900	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
56	900	900	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
57	1000	1000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
58	1000	1000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
59	1000	1000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
60	1000	1000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000

Tabla 4: Tabla de validación cruzada del Análisis Discriminante Lineal con los resultados de clasificación de cada muestra. CV (cross-validation); N (no quemado).

Posteriormente se realizó un segundo análisis sobre dos muestras procedentes de dos experimentos desarrollados en condiciones no controladas. Los resultados aparecen en la tabla 5.

	N	50	100	150	200	250	300	350	400	500	600	700	800	900	1000
Calcinado	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
Asado	0,000	0,000	0,000	0,644	0,356	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabla 5. Resultados de las nuevas observaciones a partir de la base de datos generada en el experimento (*training data*).

Como podemos ver, el porcentaje de asociación a altas temperaturas, es decir, con un hueso calcinado es del 100%; pero este porcentaje se reduce significativamente cuando observamos el segundo caso, que asegura con casi un 65% de probabilidad la temperatura del horno en 150°C. No obstante, este resultado refleja la problemática de que los huesos quemados con tejidos blandos no obtienen directamente la temperatura a la que se expone el cuerpo. Así, el resultado es de 0,64 para la temperatura de 150°C y 0,36 para 200°C.

Incluso si tenemos en cuenta que un horno doméstico sufre fluctuaciones de temperatura a lo largo de la cocción y que no está tan bien aislado del entorno como lo estaría una mufla, los resultados soportan las conclusiones observadas en la tabla 4 con nuestros datos originales. El LDA presenta un porcentaje de asociación mayor cuanto mayor sea la temperatura a partir de los parámetros utilizados.

5.DISCUSIÓN

El análisis de muestras óseas quemadas es de vital importancia tanto en el campo de las Ciencias forenses como en el de la Arqueología, ya que nos permite concretar los casos más allá del aspecto y coloración de los huesos.

En este aspecto, la técnica de análisis FTIR-ATR es una técnica adecuada ya que nos permite calcular varios parámetros al mismo tiempo, el coste humano y económico es menor que en otras técnicas y nos permite obtener una visión global de lo que está ocurriendo en la muestra a medida que aumenta la temperatura o el tiempo de exposición. Además de ser una técnica complementaria con otros análisis que permiten precisar mejor el sistema cristalino y sus cambios como es la difracción de rayos X.

Gracias a los 13 parámetros estudiados, podemos estimar la evolución de estas muestras a lo largo de un gradiente térmico y temporal. En primer lugar, podemos observar como la fracción orgánica disminuye rápidamente, de tal forma que los lípidos desaparecen a los 200°C.

Por otra parte, las amidas se relacionan con la cantidad de colágeno y materia orgánica que nos podríamos encontrar en la muestra, siendo un indicativo para evaluar si se puede extraer ADN de muestras quemadas. Dado que las amidas III disminuyen casi inmediatamente tras aumentar la temperatura, tendremos que centrar nuestra atención en las amidas I, pero incluso éstas desaparecen progresivamente y hacia los 250°C el porcentaje de colágeno presente es menor del 1%, por lo que un análisis de ADN será sumamente difícil en dichas condiciones.

Por otra parte, y coincidiendo con los resultados obtenidos por Mamede y colegas (2018), los grupos OH⁻ sólo se empiezan a distinguir a partir de los 700°C y hasta los 1000°C. Sin embargo, mientras que la cantidad de hidroxilos a 700°C no fue suficiente para que estos autores pudieran calcular la cantidad exacta de hidroxilos en una longitud de onda de 630 cm⁻¹, en este experimento si lo es, debido a que, se utilizaron huesos actuales y, por tanto, la hidroxiapatita no habría sufrido un proceso de diagenético que dificultara su análisis.

En cuanto a los índices de carbonatos API y BPI, observamos aquí una desviación de la norma. En anteriores experimentos(Thompson et al., 2013; Ellingham et al., 2016), ambos índices disminuyen según aumenta la temperatura, pero lo hacen a un ritmo diferente. Así, los carbonatos de tipo B normalmente desaparecen a mayor velocidad que los de tipo A. Esto es debido a su posición dentro de la red de bioapatita, ya que mientras los carbonatos de tipo A se sitúan perpendiculares al axis, los carbonatos de tipo B se sitúan paralelos a este. Esto se traduce

en que los de tipo B son generalmente más susceptibles a altas temperaturas (Marques et al, 2018).

Sin embargo, en nuestro experimento, la proporción de carbonatos A disminuye a mayor velocidad que la de tipo B y, por tanto, API presenta una pendiente mucho más pronunciada que BPI. Esto podría ser explicado porque los carbonatos A se encuentran altamente influenciados por la amida II en este índice, la cual no desaparecerá hasta los 300°C.

En cuanto al análisis estadístico, la utilización de PCA y LDA nos permite interpretar los cambios más importantes dentro de la estructura ósea, así como ayudarnos a predecir la temperatura de futuras muestras con una precisión bastante alta, como se ha observado en otros trabajos (Thompson et al., 2013).

Como se puede observar, el análisis de componentes principales divide básicamente las muestras en tres subgrupos según la temperatura, ya que, dependiendo de ésta, el hueso se expone a una serie de transformaciones: Desaparición de lípidos y materia orgánica, desaparición de carbonatos y aparición de hidroxilos. Thompson y colaboradores (2013) expusieron el porqué de estas tres etapas: La primera se debe a la desaparición de agua y materia orgánica en la estructura ósea, la segunda se produce por la recristalización de la bioapatita y, la tercera, es el resultado de una reordenación de la estructura cristalina.

Estudios previos de huesos quemados utilizando el FTIR aseguran que toda la materia orgánica se pierde entre los 500°C y hasta los 700°C dependiendo de la cantidad de horas a las que se expone el hueso a tal temperatura. Si seguimos aumentando la temperatura una vez llegamos a los 700°C, nos quedaremos solo con una bioapatita recristalizada (Mamede et al., 2018).

A partir de este trabajo se ha podido observar que la combinación de los diferentes parámetros utilizados en la bibliografía (Lebon et al., 2010; Thompson et al., 2013, Ellingham et al., 2016; Mamede et al., 2018) puede ser de gran ayuda en la estimación de temperaturas de una forma rápida y económica. No obstante, debe tenerse en cuenta que el tiempo de exposición es una variable a tener en cuenta tal y como mostraron Greiner et al., 2019. Para obtener unos resultados más precisos ATR-FTIR debe complementarse con difracción de rayos X y microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopía RAMAN para determinar los cambios precisos de recristalización, tamaño y forma de la bioapatita y la degradación de las fibras de colágeno.

6.CONCLUSIONES

En este trabajo, se ha utilizado la técnica ATR-FTIR para el análisis de muestras óseas experimentales, analizando 13 parámetros (Am/P, IRSF, C/P, BPI, API, C/C, CO₃/PO₄, AmI/C, FWHM, AmIII/P, 3572/1035, 3572/603 y PHT) y llegando a las siguientes conclusiones:

- La composición química y la cristalización cambian conforme aumenta la temperatura o el tiempo de exposición. Además, se puede intuir que un aumento del tiempo de exposición tendrá los mismos resultados que un aumento en la temperatura.
- La determinación de la temperatura a la que se han expuesto las muestras se puede asignar de manera imprecisa a través de las características físicas de los huesos (color), o con más precisión a través de un análisis mediante FTIR-ATR.
- Nuestro PCA es capaz de explicar un 91% de la varianza obtenida durante el análisis y el LDA puede predecir con un 80% de asociación la temperatura a la que fueron quemados los huesos mediante los datos proporcionados por el análisis de FTIR. Sin embargo, debemos tener en cuenta que, a bajas temperaturas, la fiabilidad de este análisis no es demasiado alta y solo aumenta la precisión conforme aumenta la temperatura.
- El ATR-FTIR es una herramienta útil a la hora de analizar huesos en el ámbito forense.
- Las principales variables a tener en cuenta en la discriminación de temperaturas son Am/P, AMIII/P, C/P y FWHM para bajas temperaturas (50°C-250°C), mientras que IRSF, C/C y los índices relativos a grupos OH- son capaces de discriminar las temperaturas de los huesos calcinados (>500°C).

7.PERSPECTIVAS DE FUTURO

Como perspectivas de futuro, este experimento podría ser complementado con otro tipo de técnicas como puede ser el análisis mediante la difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión (TEM) o espectroscopía Raman.

Además, para implementar esta técnica en estudios forenses, sería interesante conocer el espectro FTIR de los principales acelerantes utilizados en bombas y cómo afectan estos a la composición química final de las muestras. Así, en zonas de grandes desastres provocados (por ejemplo, terrorismo), podríamos conocer qué acelerantes se han utilizado y el estado de conservación de las principales biomoléculas a partir de un único análisis.

En el campo de la Arqueología, también deberían complementarse con otro tipo de muestras, como pueden ser cocinadas, hervidas etc., pues las condiciones de su combustión afectan tanto a las propiedades físicas como químicas del hueso.

Por último, sería conveniente comparar los resultados obtenidos con muestras quemadas en situaciones no controladas, y como el viento, la proporción de oxígeno y el tipo de materia orgánica a su alrededor pueden afectar a la composición final de los huesos.

8.BIBLIOGRAFÍA

1. Cáceres, I.(2002); *Tafonomía de yacimientos antrópicos en karst. complejo galería (sierra de atapuerca, burgos), vanguard cave (gibraltar) y abric romaní (capellades, Barcelona)*
2. Cascant et al.(2017); *Burned bones forensic investigations employing near infrared spectroscopy. Vibrational Spectroscopy*; <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.02.005>
3. Chadeaux C, Hô A Le, Bellot-gurlet L, Ina R (2009) *Curve-Fitting Micro-Atr-Ftir Studies of the Amide I and Ii Bands of Type I Collagen in. e-PRESERVATIONScience*
4. Del Valle, H.;(2021); *Evaluación de la preservación de ADN en restos óseos forenses y arqueológicos a través de espectroscopía ATR-FTIR*
5. Efremov, J.A.;(1940);*Taphonomy:new branch of paleontology*.PanAmerican Geologist LXXIV, 1-12
6. Ellingham, S.; Thompson, T.; Islam, M; Taylor, G.; (2015); *Estimating temperature exposure of burnt bone — A methodological review*; Science and Justice <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.12.002>
7. Ellingham, S.;Thompson, T.; Islam, M.;(2016); *The Effect of Soft Tissue on Temperature Estimation from Burnt Bone Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy*; Journal of Forensic Sciences doi: 10.1111/1556-4029.12855
8. Fernandez-Jalvo, Y.; Andrews, P.(2016); *Atlas of Taphonomic Identifications*, Springer; doi 10.1007/978-94-017-7432-1

9. Greiner, M., Rodríguez-Navarro, A., Heinig, M.F., Mayer, K., Kocsis, B., Göhring, A., Toncala, A., Grupe, G., Schmahl, W.W.(2019). *Bone incineration: An experimental study on mineral structure, colour and crystalline state* Journal of Archaeological Science.. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2019.05.009>
10. Haglund, W.; Sorg, M.(2002) *Advances in Forensic Taphonomy*; CRS Press LLC; ISBN 0-8493-1189-6
11. Hollund H (2013) *Diagenetic screening of bone samples; tools to aid taphonomic and archaeometric investigations*. Vrije Universiteit, Amsterdam
12. Kimura-Suda H, Ito T (2017) *Bone quality characteristics obtained by Fourier transform infrared and Raman spectroscopic imaging*. Journal of Oral Biosciences. <https://doi.org/10.1016/j.job.2017.04.002>
13. Kontopoulos I, Penkman K, Mullin VE, et al (2020) *Screening archaeological bone for palaeogenetic and palaeoproteomic studies*. PLOS One. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235146>
14. Kontopoulos I, Presslee S, Penkman K, Collins MJ (2018) *Preparation of bone powder for FTIR-ATR analysis: The particle size effect*. Vibrational Spectroscopy <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.09.004>
15. Lebon M, Reiche I, Gallet X, et al (2016) *Rapid quantification of bone collagen content by ATR-FTIR spectroscopy*. Radiocarbon. <https://doi.org/10.1017/RDC.2015.11>
16. Lebon, M.; Reiche, I.; Bahain, J.; Chadeaux, C.; Moigne, A.; Frohlich, F.; Sémah, F.; Schwarcz, H.; Falguères, C.;(2010); *New parameters for the characterization of diagenetic alterations and heat-induced changes of fossil bone mineral using Fourier transform infrared spectrometry*; Journal of Archaeological Science <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.03.024>
17. Leskovar, T.; Zupanic, I.; Gersak, Z.; Jerman, I.; Cresnar, M.(2020); *ATR-FTIR spectroscopy combined with data manipulation as a pre-screening method to assess DNA preservation in skeletal remains*; Forensic Science International: Genetics <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102196>
18. Madupalli, H.; Pavan, B.; Tecklenburg, MMJ; (2017) ;*Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite*; Journal of Solid State Chemistry <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2017.07.025>
19. Mamede, A.; Vassalo, A.; Piga, G.; Cunha, E.; Parker, S.; Marques, M.; Batista de Carvalho, L.; Gonçalves, D. (2018) *Potential of Bioapatite Hydroxyls for Research on Archeological Burned Bone*, Analytical Chemistry; DOI: 10.1021/acs.analchem.8b02868
20. Marques, M.; Mamede, A.; Vassalo, A.; Makhoul, C.; Cunha, E.; Gonçalves, D.; Parker, S.; Batista de Carvalho L. (2018) *Heat-induced bone diagenesis probed by vibrational Spectroscopy* Scientific Reports; <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34376-w>
21. Pasteris JD, Yoder CH, Wopenka B (2014) *Minerals in the human body: Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: The key 31 to a better understanding of bone mineral*. American Mineralogist. <https://doi.org/10.2138/am.2014.4627>
22. Reidsma, F.; Van Hoesel, A.; Van Os, B; Megens, L.; Braadbaart, F.(2016) *Charred bone: Physical and chemical changes during laboratory simulated heating under*

- reducing conditions and its relevance for the study of fire use in archaeology*; Journal of Archaeological Science: Reports <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.10.001>
23. Shipman,P.; Foster,G.; Schoeninger, M.:(1984); *Burnt Bones and Teeth: an Experimental Study of Color, Morphology, Crystal Structure and Shrinkage*; Journal of Archaeological Science [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(84\)90013-X](https://doi.org/10.1016/0305-4403(84)90013-X)
 24. Snoeck C, Lee-Thorp JA, Schulting RJ (2014) *From bone to ash: Compositional and structural changes in burned modern and archaeological bone*. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2014.08.002>
 25. Sponheimer M, Lee-Thorp JA (1999) *Alteration of enamel carbonate environments during fossilization* Journal of Archaeological Science. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0293>
 26. Steiner, M.; Kuhn, S.:(1995); *Differential Burning, Recrystallization, and Fragmentation of Archaeological Bone*, Journal of Archaeological Science <https://doi.org/10.1006/jasc.1995.0024>
 27. Thompson, T.; Islam, M.; Bonniere,M.:(2013); *A new statistical approach for determining the crystallinity of heat-altered bone mineral from FTIR spectra*; Journal of Archaeological Science <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.07.008>
 28. Trueman CNG, Behrensmeyer AK, Tuross N, Weiner S (2004) *Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: Diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids*. Journal of Archaeological Science. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2003.11.003>
 29. Weiner S, Bar-Yosef O (1990) *States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: A survey*. Journal of Archaeological Science. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(90\)90058-D](https://doi.org/10.1016/0305-4403(90)90058-D)
 30. Wright LE, Schwarcz HP (1996) *Infrared and Isotopic Evidence for Diagenesis of Bone Apatite at Dos Pilas, Guatemala: Palaeodietary Implications*. Journal of Archaeological Science. <https://doi.org/10.1006/jasc.1996.0087>

9. ANEXOS

1. Tabla con los resultados de los parámetros (mean±SD). Para calcular el contenido de colágeno se utilizó el protocolo propuesto en Lebon et al., 2016 el cual se calcula: Colágeno wt%= 113.13 Am/P+1.69; N wt%= 20.6 Am/P+0.31.

MUESTRA	FWHM		IRSF		C/P		C/C		API		BPI		CO ₃ /PO ₄		3572/1035		3572/603		PHT		Am/P		COLAGENO		Am/C ₁		AmIII/P	
	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	%Nwt	%coll	X	SD	X	SD
5	105,844	2,351	3,025	0,047	0,310	0,115	0,910	0,004	0,601	0,006	0,647	0,016	0,138	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,158	0,002	3,571	19,595	0,912	0,015	0,050	0,003
6	107,072	0,626	2,891	0,048	0,327	0,122	0,956	0,017	0,666	0,046	0,692	0,012	0,142	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,171	0,009	3,827	21,000	0,918	0,057	0,054	0,005
7	102,466	1,851	3,130	0,015	0,287	0,104	0,841	0,001	0,447	0,001	0,594	0,003	0,141	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,126	0,000	2,905	15,940	0,797	0,005	0,033	0,001
8	96,985	0,567	3,162	0,044	0,260	0,093	0,848	0,003	0,428	0,004	0,533	0,005	0,128	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,122	0,001	2,817	15,455	0,836	0,003	0,032	0,000
9	103,985	0,184	3,063	0,011	0,376	0,139	0,821	0,002	0,547	0,002	0,782	0,012	0,191	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,147	0,002	3,335	18,298	0,710	0,011	0,041	0,000
10	105,106	0,125	3,085	0,019	0,286	0,107	0,872	0,002	0,558	0,011	0,573	0,010	0,133	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,149	0,002	3,372	18,503	0,952	0,004	0,042	0,001
11	106,435	1,608	3,062	0,017	0,324	0,122	0,873	0,001	0,621	0,005	0,670	0,010	0,148	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,160	0,001	3,612	19,823	0,901	0,019	0,046	0,001
12	116,867	0,142	2,904	0,030	0,345	0,133	0,919	0,003	0,583	0,003	0,669	0,009	0,153	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,162	0,000	3,641	19,983	0,866	0,002	0,047	0,001
13	98,698	1,889	3,180	0,011	0,266	0,096	0,870	0,005	0,545	0,017	0,576	0,013	0,129	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,137	0,001	3,135	17,204	0,896	0,003	0,037	0,001
14	96,158	0,073	3,257	0,009	0,255	0,090	0,843	0,001	0,388	0,002	0,510	0,003	0,134	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,113	0,001	2,647	14,523	0,790	0,001	0,029	0,000
15	94,089	0,913	3,168	0,032	0,247	0,090	0,868	0,004	0,472	0,006	0,520	0,011	0,125	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,130	0,000	2,994	16,426	0,922	0,012	0,030	0,001
16	91,431	1,507	3,146	0,035	0,265	0,098	0,952	0,006	0,488	0,007	0,547	0,006	0,130	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,136	0,002	3,111	17,070	0,892	0,005	0,042	0,001
17	89,692	0,595	3,229	0,026	0,246	0,087	0,881	0,001	0,446	0,010	0,522	0,011	0,125	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,123	0,002	2,851	15,644	0,855	0,002	0,029	0,000
18	89,214	2,236	3,310	0,005	0,217	0,075	0,848	0,000	0,343	0,006	0,438	0,012	0,121	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,091	0,000	2,190	12,013	0,700	0,004	0,014	0,001
19	83,641	0,624	3,354	0,036	0,223	0,078	0,899	0,003	0,396	0,003	0,483	0,005	0,123	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,108	0,001	2,538	13,923	0,790	0,012	0,022	0,001
20	84,683	3,217	3,288	0,077	0,206	0,087	0,855	0,031	0,360	0,041	0,446	0,047	0,111	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,093	0,015	2,218	12,168	0,725	0,063	0,014	0,007
21	81,950	0,260	3,424	0,092	0,183	0,065	0,833	0,001	0,321	0,002	0,394	0,003	0,103	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,079	0,002	1,945	10,666	0,680	0,002	0,006	0,005
22	76,384	0,120	3,372	0,362	0,174	0,058	0,789	0,005	0,214	0,003	0,414	0,005	0,112	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,001	0,814	4,460	0,198	0,005	0,000	0,000
23	73,903	0,688	3,742	0,035	0,146	0,049	0,800	0,005	0,214	0,005	0,357	0,014	0,101	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,603	3,297	0,110	0,003	0,000	0,000
24	74,609	0,417	3,666	0,082	0,159	0,051	0,805	0,002	0,208	0,016	0,379	0,030	0,103	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,001	0,580	3,171	0,113	0,001	0,000	0,000
25	80,142	1,742	3,468	0,048	0,192	0,064	0,792	0,002	0,201	0,006	0,440	0,020	0,122	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,001	0,707	3,870	0,138	0,004	0,000	0,000
26	75,026	1,553	3,723	0,045	0,150	0,051	0,818	0,003	0,201	0,010	0,355	0,010	0,096	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,443	2,423	0,067	0,003	0,000	0,000

27	73,730	0,098	3,778	0,034	0,147	0,048	0,832	0,001	0,145	0,001	0,358	0,004	0,097	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,517	2,828	0,103	0,004	0,000	0,000	
28	71,847	0,169	3,891	0,025	0,129	0,043	0,853	0,001	0,145	0,004	0,328	0,003	0,086	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,593	3,246	0,155	0,003	0,000	0,000	
29	74,248	0,726	3,661	0,141	0,147	0,050	0,841	0,009	0,140	0,018	0,343	0,039	0,097	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	0,558	3,053	0,121	0,011	0,000	0,000	
30	72,409	0,657	3,905	0,024	0,128	0,041	0,884	0,001	0,100	0,003	0,311	0,006	0,090	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,001	0,551	3,013	0,124	0,005	0,000	0,000	
31	72,820	0,752	3,970	0,024	0,116	0,035	0,927	0,002	0,076	0,003	0,281	0,006	0,087	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,481	2,631	0,096	0,004	0,000	0,000	
32	74,024	3,134	3,915	0,103	0,124	0,039	0,910	0,007	0,073	0,004	0,295	0,017	0,093	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,506	2,766	0,104	0,002	0,000	0,000	
33	75,110	0,925	3,915	0,048	0,117	0,037	0,932	0,001	0,084	0,001	0,269	0,003	0,089	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,519	2,837	0,114	0,002	0,000	0,000	
34	70,919	0,065	4,031	0,052	0,110	0,035	0,977	0,002	0,084	0,000	0,271	0,002	0,080	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,493	2,697	0,100	0,000	0,000	0,000	
35	66,055	0,017	4,372	0,006	0,096	0,030	1,006	0,000	0,064	0,001	0,245	0,001	0,066	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,479	2,616	0,102	0,004	0,000	0,000	
36	69,770	1,830	4,194	0,110	0,113	0,035	0,971	0,006	0,070	0,004	0,285	0,008	0,081	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,001	0,484	2,643	0,090	0,003	0,000	0,000	
37	70,976	0,365	4,002	0,155	0,109	0,035	1,012	0,007	0,069	0,002	0,272	0,007	0,079	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,505	2,760	0,104	0,004	0,000	0,000	
38	69,738	0,320	4,175	0,159	0,108	0,033	1,028	0,005	0,071	0,002	0,270	0,007	0,078	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,482	2,637	0,087	0,004	0,000	0,000	
39	63,029	1,344	4,895	0,040	0,075	0,024	1,049	0,003	0,040	0,002	0,183	0,008	0,054	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,443	2,422	0,113	0,003	0,000	0,000	
40	64,714	0,600	4,752	0,060	0,086	0,028	1,040	0,005	0,047	0,005	0,208	0,011	0,064	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,450	2,460	0,099	0,002	0,000	0,000	
41	61,683	2,773	5,247	0,058	0,073	0,023	1,075	0,010	0,039	0,003	0,177	0,003	0,055	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,421	2,298	0,092	0,005	0,000	0,000	
42	60,568	1,957	6,700	0,278	0,052	0,016	1,141	0,042	0,027	0,005	0,110	0,017	0,041	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,001	0,443	2,419	0,157	0,041	0,000	0,000	
43	58,256	2,542	6,261	0,315	0,048	0,015	1,240	0,010	0,029	0,005	0,114	0,009	0,039	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,001	0,500	2,736	0,235	0,027	0,000	0,000	
44	61,442	0,529	5,768	0,607	0,054	0,018	1,089	0,003	0,022	0,002	0,526	0,697	0,037	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,440	2,402	0,162	0,002	0,000	0,000	
45	62,077	4,338	5,709	0,514	0,035	0,012	1,311	0,024	0,009	0,001	0,073	0,005	0,025	0,004	0,008	0,001	0,015	0,001	0,435	0,015	0,002	0,000	0,356	1,941	0,077	0,008	0,000	0,000
46	61,642	2,650	5,437	0,273	0,018	0,006	1,369	0,017	0,006	0,000	0,040	0,001	0,014	0,002	0,012	0,002	0,023	0,003	0,513	0,008	0,002	0,000	0,361	1,970	0,169	0,008	0,000	0,000
47	52,763	5,433	6,303	0,215	0,013	0,004	1,447	0,019	0,005	0,001	0,029	0,000	0,007	0,001	0,009	0,002	0,019	0,001	0,466	0,009	0,001	0,000	0,340	1,853	0,081	0,014	0,000	0,000
48	50,429	3,576	6,370	0,203	0,013	0,004	1,293	0,035	0,005	0,002	0,037	0,001	0,008	0,001	0,014	0,001	0,029	0,002	0,489	0,002	0,001	0,000	0,331	1,807	0,059	0,004	0,000	0,000
49	67,587	2,550	5,076	0,176	0,026	0,009	1,550	0,049	0,014	0,004	0,056	0,005	0,020	0,002	0,011	0,003	0,021	0,005	0,496	0,010	0,002	0,001	0,342	1,867	0,037	0,012	0,000	0,000
50	68,573	5,305	5,058	0,125	0,016	0,005	1,887	0,008	0,016	0,005	0,039	0,004	0,019	0,002	0,014	0,001	0,026	0,004	0,498	0,009	0,001	0,000	0,340	1,855	0,052	0,008	0,000	0,000
51	68,097	6,003	5,042	0,127	0,015	0,005	1,936	0,019	0,016	0,002	0,036	0,002	0,014	0,003	0,015	0,001	0,028	0,003	0,512	0,007	0,002	0,000	0,344	1,877	0,043	0,012	0,000	0,000
52	70,726	5,145	4,870	0,123	0,016	0,005	1,914	0,084	0,017	0,007	0,036	0,001	0,009	0,001	0,014	0,001	0,027	0,002	0,513	0,011	0,002	0,001	0,342	1,866	0,048	0,014	0,000	0,000
53	77,646	0,271	4,310	0,298	0,022	0,007	2,157	0,009	0,023	0,000	0,049	0,002	0,030	0,006	0,007	0,001	0,013	0,002	0,454	0,008	0,001	0,000	0,322	1,754	0,039	0,009	0,000	0,000
54	75,239	0,215	4,510	0,190	0,014	0,005	2,277	0,027	0,011	0,001	0,030	0,001	0,014	0,002	0,007	0,000	0,013	0,001	0,479	0,006	0,000	0,000	0,319	1,737	0,044	0,012	0,000	0,000
55	77,288	5,836	4,823	0,027	0,011	0,004	2,573	0,024	0,015	0,008	0,024	0,004	0,018	0,001	0,010	0,001	0,018	0,003	0,481	0,006	0,001	0,001	0,334	1,820	0,056	0,028	0,000	0,000
56	73,850	0,683	4,679	0,024	0,010	0,003	2,379	0,113	0,007	0,000	0,022	0,001	0,007	0,004	0,010	0,000	0,018	0,001	0,503	0,007	0,000	0,000	0,315	1,717	0,012	0,006	0,000	0,000

57	74,419	1,892	4,571	0,252	0,011	0,003	2,622	0,201	0,014	0,003	0,023	0,003	0,011	0,005	0,009	0,001	0,017	0,002	0,453	0,010	0,001	0,000	0,327	1,784	0,067	0,048	0,000	0,000
58	77,306	3,203	4,493	0,177	0,005	0,002	3,619	0,630	0,002	0,001	0,011	0,002	0,002	0,001	0,009	0,002	0,015	0,004	0,485	0,006	0,001	0,000	0,323	1,762	0,103	0,041	0,000	0,000
59	80,553	3,974	4,221	0,217	0,006	0,002	2,371	0,501	0,002	0,003	0,011	0,002	0,000	0,000	0,011	0,002	0,019	0,004	0,489	0,018	0,001	0,000	0,322	1,758	0,110	0,050	0,000	0,000
60	75,623	0,781	4,686	0,071	0,006	0,002	2,258	0,169	0,011	0,002	0,011	0,002	0,000	0,000	0,010	0,001	0,019	0,001	0,466	0,003	0,002	0,000	0,347	1,891	0,122	0,022	0,000	0,000
Control 1	103,509	1,573	2,988	0,038	0,302	0,108	0,872	0,007	0,558	0,003	0,635	0,002	0,133	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143	0,001	3,254	17,856	0,833	0,007	0,036	0,001
Control 2	109,917	16,504	2,987	0,077	0,306	0,115	0,876	0,007	0,644	0,058	0,659	0,025	0,127	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,157	0,002	3,552	19,491	0,951	0,006	0,047	0,001
Control 3	90,815	0,058	3,063	0,021	0,281	0,101	0,885	0,000	0,710	0,001	0,687	0,001	0,124	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,156	0,000	3,514	19,286	0,955	0,003	0,046	0,000
Control 4	103,599	3,354	2,986	0,035	0,295	0,108	0,865	0,004	0,612	0,005	0,648	0,008	0,126	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,154	0,001	3,480	19,095	0,939	0,014	0,042	0,001

2. Boxplot del resto de parámetros

