



**Universitat Rovira i Virgili**

Departamento de Bioquímica y Biotecnología

**Máster en Genética, Física y Química Forense**

Trabajo de Fin de Máster:

**Evaluación de la preservación de ADN en restos óseos  
forenses y arqueológicos a través de espectroscopía  
ATR-FTIR**

Héctor Del Valle Blanco

**Tutora académica:** Ximena Terra Barbadora

**Tutora profesional:** Isabel Cáceres Cuello de Oro

Facultat de Química URV  
Institut de Paleoecologia Humana i Evolució Social

*Septiembre 2021*



# Índice

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN.....   | 1  |
| ABSTRACT .....   | 1  |
| 1. Introducción .....  | 2  |
| 1.1 Estructura del tejido óseo .....   | 4  |
| 1.2. Procesos tafonómicos: Diagénesis molecular y preservación de ADN.....   | 6  |
| 2. Objetivos .....   | 8  |
| 3. Material y métodos.....   | 9  |
| 3.1. Material .....  | 9  |
| 3.1.1 Muestras arqueológicas de la Cova de les Agulles.....                  | 9  |
| 3.1.2 Muestras arqueológicas del Roc de les Orenetes.....                    | 10 |
| 3.1.3 Muestras siglo XX-actualidad .....                                     | 10 |
| 3.2 Preparación de muestras .....  | 11 |
| 3.3 Espectroscopía ATR-FTIR.....   | 12 |
| 3.4 Análisis de ADN .....  | 14 |
| 3.4.1 Extracción de ADN a partir de restos óseos .....                       | 14 |
| 3.4.2 Cuantificación por Q-PCR .....   | 15 |
| 3.5 Análisis estadístico .....   | 15 |
| 4. Resultados .....  | 16 |
| 4.1. ATR-FTIR.....   | 16 |
| 4.2. Cuantificación de ADN .....   | 20 |
| 4.3 Análisis estadístico PCA, Correlaciones y Regresión lineal múltiple..... | 22 |
| 5. Discusión.....  | 26 |
| 6. Conclusiones .....  | 28 |
| 7. Perspectivas de futuro y aplicabilidad.....                               | 28 |
| 8. Bibliografía.....   | 29 |
| 9. ANEXO I.....  | 32 |

## Abreviaturas

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa

**ATR-FTIR:** *Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier acoplada a reflectancia total atenuada.

**DRIFT:** *Diffusive-Reflectance infrared Fourier transform*. Espectroscopía FTIR de reflectancia difusa.

**KBr pellets:** pastillas de bromuro de potasio

**msnm:** metros sobre el nivel del mar

**cal BP:** *calibrated years before present*. Escala de tiempo usada principalmente en Arqueología y Geología, entendida como años antes del presente con origen en 1950.

**BCE:** *years before the Common Era*. Término alternativo a d.C. CE es empleado como alternativo a a.C.

**U.E:** Unidad estratigráfica

## **RESUMEN**

La recuperación, extracción y análisis de ADN y proteínas de restos óseos suele ser habitual en las disciplinas forenses y arqueológicas. Sin embargo, estos restos están expuestos a multitud de procesos tafonómicos desde la muerte del individuo, que van degradando las biomoléculas. Esta problemática junto a la inversión de tiempo, recursos y el carácter destructivo de los análisis de ADN y de proteínas, hace necesaria la investigación de métodos de optimización de muestras. Estos métodos deben ser económicos, rápidos y mínimamente destructivos. Este es el caso del uso de espectroscopias como RAMAN o FTIR. En este estudio se han analizado 27 muestras de dientes y huesos actuales y antiguos mediante 11 parámetros diagenéticos y evaluado su asociación con el contenido de ADN. Las muestras se limpiaron y pulverizaron siguiendo los estrictos procedimientos para la extracción de ADN antiguo. Se han establecido correlaciones que han permitido relacionar el estado de conservación de los restos con su contenido de ADN. Se ha podido observar diferencias entre los distintos contextos. Se ha encontrado una relación fuerte entre la cristalinidad (IRSF) y el contenido de amidas (Amida I y Amida III). Los resultados han permitido establecer parámetros que se relacionen con el contenido de ADN, como AmI/C<sub>1</sub>, AmI/C<sub>2</sub> y FWHM para  $\nu_3(\text{PO}_4)$ . También se ha conseguido establecer un modelo predictivo a través de la variable FWHM. Estos resultados preliminares son prometedores y de notable importancia para la investigación de biomoléculas en el ámbito forense y arqueológico, por lo que su investigación y validación continuarán en trabajos futuros.

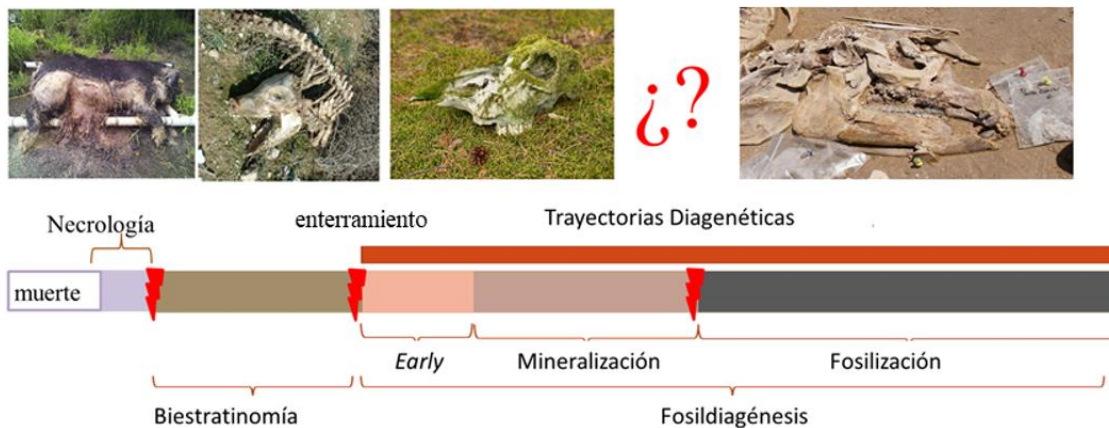
## **ABSTRACT**

Recovery, extraction and analysis of DNA and proteins from bone remains are common in forensic and archaeological fields. However, these remains are exposed to a multitude of taphonomic processes since the death of the individual that degrades biomolecules. This issue, in addition to the investment of time, resources and destructive nature of DNA and protein analysis, makes it necessary to investigate sample optimization methods. These methods must be economical, fast and slightly destructive. This is the case of spectroscopies such as RAMAN or FTIR. In this study, an analysis of 27 samples of current and ancient teeth and bones was carried out to evaluate the DNA content through 11 diagenetic parameters. Samples were cleaned and pulverized following strict procedures for ancient DNA extraction. Correlations have been established which have made it possible to evaluate the state of conservation and DNA amount from bone remains. Differences have been observed between the contexts. A strong relationship has been found between crystallinity (IRSF) and amide amount (Amide I and Amide III). The results indicated that some of parameters analyses were related to the DNA amount. These parameters have been AmI/C<sub>1</sub>, AmI/C<sub>2</sub> and FWHM at  $\nu_3(\text{PO}_4)$ . A predictive model has been established through FWHM at  $\nu_3(\text{PO}_4)$ . These preliminary results are promising and relevant for the research of biomolecules in the forensic and archaeological field, so their research and validation will continue in upcoming works.

## 1. Introducción

Los restos óseos son uno de los principales materiales que se recuperan en escenas forenses y arqueológicas y contienen una valiosa información sobre la vida de los individuos, desde los hábitos de vida hasta la identificación individual. No obstante, la calidad de la información obtenida dependerá del estado de conservación de los restos y su degradación. Desde que un individuo muere sus restos quedan expuestos a multitud de procesos de modificación y degradación que inducen cambios físicos, químicos y biológicos, alterando y destruyendo la información de los restos. Estos cambios vienen marcados por el ambiente de deposición, ya que (Tütken et al. 2008; Pilloud et al. 2016), las condiciones de humedad, temperatura, pH, composición del suelo, actividad de microorganismos, etc., serán características del ambiente y afectarán a los restos depositados de diferente forma. Así, la degradación de los restos óseos se rige por las leyes de la Tafonomía (Lyman 1994; Fernández López 2000; Dominguez Rodrigo, M., Fernández-López y Alcalá 2011). La Tafonomía es la ciencia que estudia todos los procesos que ocurren en una acumulación tafonómica, entendida como el momento de deposición de un organismo o un conjunto de organismos desde el momento de la muerte hasta que se registra.

De manera general, se asume que la disciplina se subdivide en dos áreas. Por un lado, la Bioestratinomía, que incluye todos aquellos procesos que ocurren antes de la sedimentación y enterramiento de los restos. Y, por otro lado, la Fosildiagénesis, que abarca todos aquellos procesos, principalmente físico-químicos, que se dan tras la sedimentación y enterramiento de los restos. Un tercer término, es usado más ampliamente en la bibliografía forense, la fase necrológica. Se trata de un concepto que engloba los procesos iniciales de putrefacción y descomposición previos a la desarticulación, límite en el que comenzaría la fase bioestratinómica (Pokines y Symes 2013) (Fig.1).



**Figura 1.** Diagrama con la historia tafonómica de un cadáver desde la muerte hasta su posible fosilización. Los límites rojos marcan las etapas críticas en las que los restos pueden degradarse y desaparecer. Fotografía: Ribéreau-Gayon et al. 2018; Gerard Campeny.

Por lo tanto, la calidad del ADN forense o antiguo está en relación con el estado de conservación de los restos óseos y su historia tafonómica (Collins et al. 2002; Kendall et al. 2018; Latham y Miller 2019). Desde los años 90' se ha profundizado mucho en el conocimiento de la degradación de los huesos y dientes, no obstante la comprensión sobre la preservación del ADN continúa siendo un reto, debido a la imposibilidad de concretar qué ambientes son más agresivos y cómo y porqué se produce una buena preservación del ADN (Nielsen-Marsh and Hedges 2000; Collins et al. 2002; Hendy et al. 2018; Eriksen et al. 2020).

Debido a esta problemática, son varios los estudios que han intentado profundizar en la preservación de ADN y proteínas en restos óseos, tanto en el ámbito arqueológico como forense (Chadefaux et al. 2009; Bobroff et al. 2016; Lebon, M., Reiche, I., Gallet, X., Bellot-Gurlet, L., Zazzo 2016; Eriksen et al. 2020; Kontopoulos et al. 2020, *inter alia*). La investigación actual ha demostrado la complejidad de relacionar la degradación del tejido óseo con la cantidad de ADN. Esta problemática junto a la inversión de tiempo y recursos y el carácter destructivo que supone la obtención de ADN en restos óseos, ha llevado a dirigir la investigación a la obtención de métodos de optimización. Algunos ejemplos son los análisis de histología, los análisis de proteómica, la espectrometría de masas, la espectroscopía de infrarrojos o la racemización de aminoácidos (Collins et al. 2009; Mundorff et al. 2009; Wadsworth et al. 2017; Kontopoulos et al. 2020; Leskovar et al. 2020).

Antes de entrar en la propia problemática, comprendamos el trasfondo y bagaje detrás de la buena o mala preservación de los restos óseos y el estado actual de la investigación. Para

ello, primero haremos un breve repaso de la estructura del tejido óseo, después pasaremos a entender cómo se degrada y, finalmente, entraremos en la problemática específica de la conservación del ADN en restos esqueléticos.

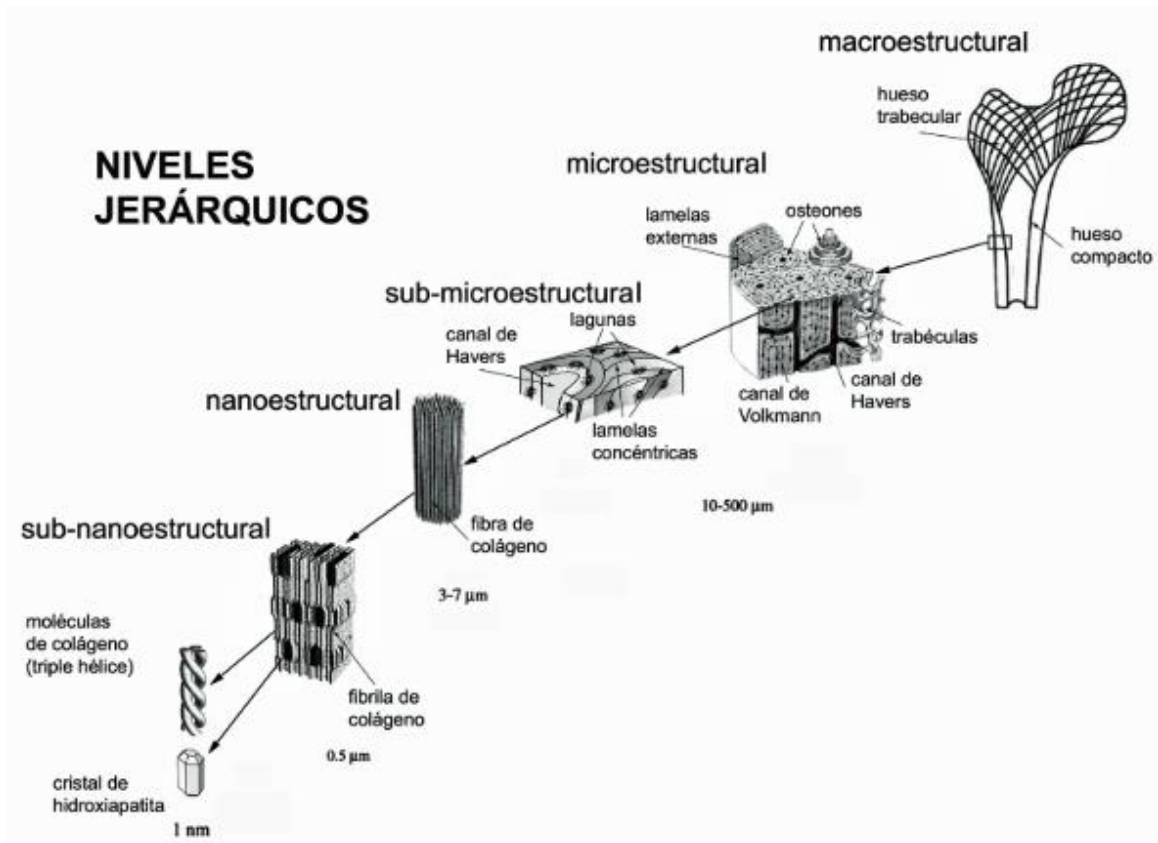
### **1.1 Estructura del tejido óseo**

El tejido óseo tiene una estructura compleja que puede estudiarse a diferentes niveles (Fig. 2) desde la estructura molecular al hueso cortical y trabecular (Rho et al. 1998; Weiner et al. 1999; Currey 2012). En este trabajo nos centraremos principalmente en el nivel sub-nanoestructural.

El hueso humano contiene en torno al 60-70 wt% de contenido mineral junto a un 20-30 wt% de fracción orgánica. No obstante, no hay un acuerdo absoluto sobre las proporciones reales de la composición del hueso, habiendo un amplio debate entre varios autores (Currey 2004; Wopenka y Pasteris 2005; Bernabéu Martínez et al. 2006; García-Garduño, Margarita Victoria; Reyes-Gasgay 2006; Pasteris et al. 2008, 2014; Weiner 2010).

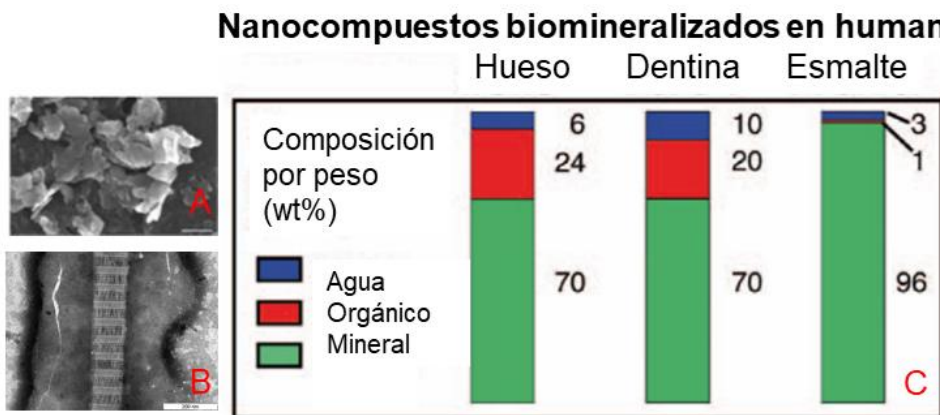
Por un lado, la fracción mineral es definida como bioapatita o hidroxiapatita carbonatada no estequiométrica,  $\text{Ca}_{10-x}[(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x](\text{OH})_{2-x} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , que contiene diversas impurezas e iones como  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ , que ayudan a estabilizar la cristalinidad en su medio fisiológico con un tamaño de 25 x 2-4nm (Pasteris et al. 2014). Se trata de un análogo biológico de la hidroxiapatita geológica  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , perteneciente al sistema cristalino hexagonal, que contendría un 4-6% de carbonatos. Estos cristales se depositan entre las fibrillas de colágeno que orientan y mantienen el tamaño de los cristales (Weiner 2010).

Por otro lado, la fracción orgánica del hueso se compone principalmente de fibras de colágeno tipo I (90% de la fracción orgánica) junto a proteínas no colágenas, proteoglicanos, osteocalcina, glicoproteínas y lípidos. Las proteínas están íntimamente relacionadas con la parte mineral del hueso, encargándose de la correcta formación de los diversos tipos de tejidos. Así, las fracciones orgánica e inorgánica componen la matriz extracelular u ósea, que supone un 98% del tejido óseo, correspondiendo el 2% restante a las células. Las células óseas pueden ser osteoprogenitoras, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos (Pasteris et al. 2008; Hendy et al. 2018; Kendall et al. 2018). Por lo tanto, la buena preservación del ADN estará relacionada con la buena preservación de la matriz ósea.



**Figura 2.** Niveles jerárquicos del tejido óseo. Fuente: Barrientos et al. 2016

En el caso de los dientes, los compuestos son los mismos. No obstante, las proporciones son diferentes dando lugar a 2 tipos de tejidos bien diferenciados: esmalte y dentina. En el caso del esmalte, el 99 wt% corresponde a cristales de hidroxiapatita carbonatada con una longitud y espesor mayor que los cristales del tejido óseo, 130 x 30 nm (Legeros and Legeros 1984). La fracción orgánica corresponde a 1 wt%, mientras que la dentina es un tejido más cercano al tejido óseo (Fig.3).



**Figura 3.** Componentes mayoritarios de los tejidos óseo y dental. A) cristales de hidroxiapatita carbonatada, escala 50nm. B) Fibra de colágeno, escala 200nm. C) proporciones en peso de los diferentes compuestos mencionados en el texto. Modificado de: Pasteris et al. 2008; Weiner 2010; Del Valle y Cáceres 2020

En los siguientes niveles (sub-microestructural y microestructural) encontramos la disposición de las fibras en capas cilíndricas superpuestas denominadas lamelas, las cuales se distribuyen en torno a los canales de Havers, conductos de Volkman y las microcavidades. Este conjunto de lamelas, cavidades y canales conforman la denominada osteona, unidad fundamental del hueso en el nivel microestructural (Jans 2005; Barrientos et al. 2016).

En las microcavidades y *lacunae* se ubican los osteocitos que se encuentran irrigados por una amplia red de canales por donde circulan capilares sanguíneos. A partir de esta unidad el hueso puede adoptar una forma masiva (hueso compacto) o un sistema de poro abierto (trabecular), dando lugar al nivel macroestructural.

En el último nivel, los huesos se clasifican por rasgos anatómicos, dividiéndose así entre craneal (cráneo, mandíbula, dentición) y postcraneal, que contiene el esqueleto apendicular, axial y huesos compactos.

## **1.2. Procesos tafonómicos: Diagénesis molecular y preservación de ADN**

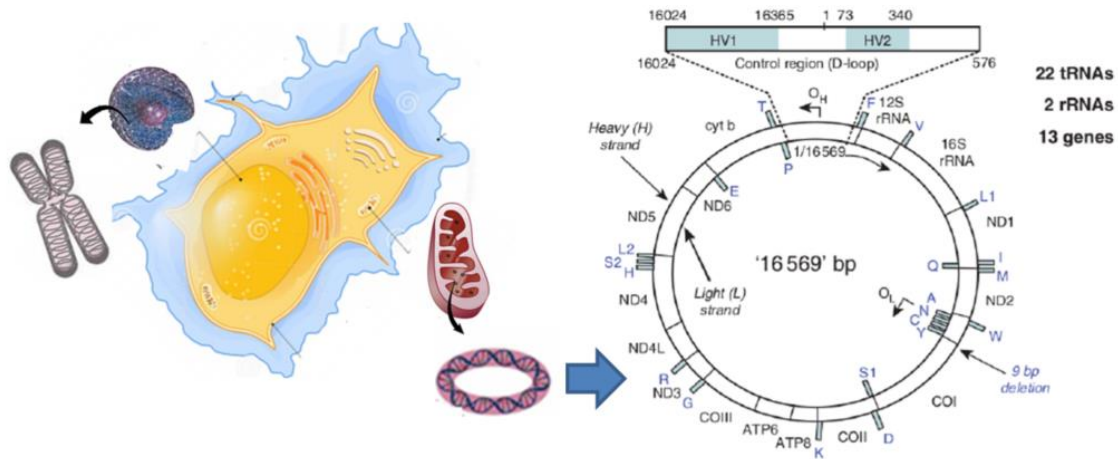
Son muchos los procesos tafonómicos que pueden intervenir en el deterioro de los restos óseos a nivel molecular, y pueden darse en cualquier etapa de la historia tafonómica (necrológica, bioestratinómica o fosildiagenética).

Diagénesis ósea hace referencia a los cambios químicos que ocurren a medida que el hueso encuentra su estabilidad en el medio en el que se deposita. Desde la ciencia tafonómica se han definido mecanismos y agentes que actúan dependiendo del medio (Smith et al. 2007 y Kistler et al. 2017).

Por lo tanto, la diagénesis molecular hace referencia a los cambios producidos en las moléculas resultado de las diversas modificaciones tafonómicas (Pokines and Symes 2013) desde el momento de la muerte y descomposición. En concreto, se ha desarrollado en el ámbito de la degradación de proteínas, principalmente colágeno, osteocalcina y ADN en restos antiguos (Bobroff et al. 2016; Lebon et al. 2016; Hendy et al. 2018; Kendall et al. 2018; Latham y Miller 2019).

Estructuralmente, el ADN o ácido desoxirribonucleico es una macromolécula compuesta por cuatro bases de nucleótidos, dos purinas de doble anillo, adenina y guanina, y dos pirimidinas de un sólo anillo, citosina y timina. Todas las bases se unen entre sí a través de un grupo fosfato y un monosacárido desoxirribosa. Los átomos de carbono forman la

molécula desoxirribosa donde los grupos fosfato se unen a los átomos 3' y 5'. Este enlace se denomina fosfodiéster, un enlace covalente que da como resultado la formación del enlace bicatenario del ADN (Watson y Crick 1953). En el caso del ADN nuclear, la cadena de polinucleótidos adopta la estructura de hélice tridimensional dextrógira. El ADN nuclear, se encuentra empaquetado en cromosomas (46 en el caso humano, 22 autosómicos y 2 sexuales) en el interior del núcleo suponiendo el 99'75% del ADN celular (Fig.4). En cambio, el ADN mitocondrial, aunque también es una molécula bicatenaria, adopta una forma circular y cerrada con un tamaño de 16.569 pb, que se distribuyen por densidad en cadena H y L. Aunque supone el 0,25% del ADN total, una célula puede contener entre cientos y miles de mitocondrias y éstas a su vez contienen varias copias del genoma. Estas características hacen que el ADN mitocondrial pueda ser más exitoso a la hora de extraer ADN antiguo.



**Figura 4.** Esquema de un osteocito y estructura del ADN mitocondrial, donde se observan las regiones hipervariables 1 y 2, las regiones más utilizadas en la secuenciación de mtADN. Modificado de Butler 2005.

El ADN contenido en la célula comienza a degradarse después de la muerte celular al igual que el resto de biomoléculas. La degradación es el resultado de la separación y pérdida de fragmentos en la estructura del ADN, la modificación química, el ataque microbiano, fúngico y húmico.

Los procesos químicos que continúan con la degradación de la cadena de ADN son la hidrólisis y la oxidación tras la muerte del individuo. La fragmentación de la cadena puede producirse por la hidrólisis del enlace fosfodiéster o de los enlaces N-glucosídicos (Fernández Domínguez 2005). Otro mecanismo de degradación ocurre con la desaminación hidrolítica, principalmente de la Citosina a Uracilo y Timina. La desaminación hidrolítica de las bases purinas (A-G) ocurre a una tasa menor que la de las pirimidinas (Latham y Miller 2019)

La oxidación se produce principalmente por radicales libres ( $O_2^+$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^-$ ), que pueden producirse tanto en reacciones celulares endógenas como por otros mecanismos (radiación UV, ataque bacteriano, etc.). El principal efecto de la oxidación es la modificación de la desoxirribosa y la transformación de las pirimidinas (C-T) en hidantoínas (Fernández Domínguez 2005). Esto se traduce en la aparición de posiciones sin bases y en puentes intermoleculares (Latham y Miller 2019).

No obstante, se ha demostrado que algunos elementos esqueléticos mantienen mayores cantidades de ADN como dientes (dentina) y huesos petrosos. Esto es debido a las características histológicas de poca porosidad y alta densidad de estos huesos, que se cree protegen del acceso de ataques microbianos (Kendall et al. 2018). El hecho de encontrar ADN mejor conservado en estos restos ha llevado al estudio de parámetros diagenéticos que indiquen el porqué de la buena preservación. Así, se ha observado que hay una relación entre la buena conservación de la hidroxiapatita y el colágeno y el éxito de obtener ADN de una muestra (Hansen et al. 2017; Kontopoulos et al. 2019).

Los factores que se han podido relacionar con la preservación de ADN son temperatura, humedad, pH y composición del suelo. Las bajas temperaturas favorecen a una ralentización de las reacciones químicas responsables de la degradación orgánica. La mayoría de las muestras más antiguas de ADN antiguo proceden de lugares con bajas temperaturas como el permafrost. En cambio, una elevada humedad favorece la penetración de sustancias orgánicas del sedimento en el interior de los restos óseos, ayudando al desarrollo de sustancias inhibitoras. Además, la humedad ayuda a la degradación hidrolítica y oxidativa (Fernandez Domínguez 2005; Kendall et al. 2018; Latham y Miller 2019). En relación con los anteriores, la composición del sedimento y su pH juegan un importante factor, un pH neutro o ligeramente alcalino favorece la preservación del ADN y de todos los componentes de huesos y dientes.

## **2. Objetivos**

En este trabajo se presenta un estudio preliminar que pretende explorar la relación entre la preservación de la parte mineral y orgánica de los restos óseos y la cantidad de ADN de dientes y huesos de diferentes cronologías. Estas asociaciones permitirían predecir el estado de conservación del ADN antes de procesar las muestras. Este análisis se ha realizado a partir de espectroscopía infrarroja acoplada a reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), una técnica que permite la cuantificación relativa de la composición química del

hueso, económica y mínimamente destructiva, ampliamente aplicada en la caracterización de la degradación ósea (Weiner y Bar-Yosef 1990; Wright y Schwarcz 1996; Smith et al. 2007; Fernández-Jalvo et al. 2010; Beasley et al. 2014; Kontopoulos et al. 2018; France et al. 2020).

Por lo tanto, el objetivo principal de este proyecto es distinguir entre especímenes con ADN bien y mal conservado a partir de información relacionada con la estructura molecular del hueso, permitiendo obtener un criterio objetivo más allá de la apariencia y coloración de las superficies óseas.

Para llevar a cabo este objetivo principal es necesario:

- Diseñar un protocolo de extracción de polvo de hueso en el que se tenga en cuenta una fracción necesaria de hueso para ATR-FTIR y otra para extracción de ADN.
- Procesar los espectros de infrarrojos a través de áreas y picos para determinar la composición química de los huesos.
- Poner a punto una metodología de extracción de ADN de muestras óseas aplicable en los laboratorios de la Facultad de Química en la URV.
- Extraer, cuantificar y amplificar ADN moderno y antiguo.
- Evaluar estadísticamente los resultados obtenidos.

### **3. Material y métodos**

#### **3.1. Material**

Para realizar este trabajo se ha escogido una muestra (n=27) de restos óseos procedente de diferentes contextos. En la Tabla 1 se exponen las muestras utilizadas. A continuación introduciremos el contexto de procedencia de cada colección de muestras.

##### **3.1.1 Muestras arqueológicas de la Cova de les Agulles**

La Cova de les Agulles se sitúa en el término municipal de Corbera de Llobregat (Baix Llobregat, Cataluña; coordenadas geográficas: UTM - ETRS89 X: 407435, Y: 4585987). Se trata de una pequeña cavidad cárstica situada junto a la vertiente izquierda de la riera de Planes, que alberga un sepulcro colectivo utilizado, de manera continuada, durante el IV milenio cal BCE (Neolítico final). La datación radiocarbónica sobre colágeno de una epífisis proximal de individuo adulto (nº.ref. Ca04-08) arrojó la cronología de  $4460 \pm 40$  cal BP (Gómez et al. 2008).

En esta cueva se han registrado 15 niveles arqueológicos de los cuales 11 poseen restos antropológicos *in situ* pero sin evidencia de conexión anatómica. Se recuperaron 519 restos óseos y 74 restos dentarios (Gómez et al. 2008), 10 de los cuales se incluyen en el presente trabajo (Tabla 1).

### **3.1.2 Muestras arqueológicas del Roc de les Orenetes**

El Roc de les Orenetes se sitúa en el municipio de Queralbs (Ripollès, Girona) a 1860 msnm (coordenadas geográficas: UTM - ETRS89 X: 427508,4756; Y: 4689390,181). Se trata de una cavidad cárstica utilizada como sepulcro colectivo y enmarcada durante el Calcolítico y Edad del Bronce (2º mitad III milenio BCE-1º mitad II milenio BCE) a falta de una datación absoluta. Se registraron 6 unidades estratigráficas (U.E.) con sedimentos compuestos por arcillas de descalcificación, bloques de caliza, esquistos, arenisca y espeleotemas con alto contenido de microcarbones. Los restos humanos se agrupan en las U.E. 3, 4 y 5, en las que se encontraron casi 2000 restos humanos, estableciendo un número mínimo de individuos (NMI) de 56 (Oliva 1976; Ramírez-Pedraza et al. 2020). Para este trabajo, se escogieron 7 dientes y 3 fragmentos postcraneales con el objetivo de testar diferencias entre tejidos (Tabla 1).

### **3.1.3 Muestras siglo XX-actualidad**

A modo de referenciales modernos, se utilizaron 7 restos dentarios procedentes de 4 individuos adultos (Tabla 1). De estos restos, 4 dientes proceden de una colección de anatomía comparada cedida por el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la URV, antiguamente utilizados como referenciales anatómicos. Los 3 dientes restantes son procedentes de 3 voluntarios actuales, uno de los cuales (Ind.2) procede de una extracción odontológica de 2021, mientras que los otros dos proceden de dos extracciones realizadas en 2020 (Ind.4) y 2019 (Ind.3).

| Referencia  | Elemento                           | Taxón             |
|-------------|------------------------------------|-------------------|
| CA04/11/30  | p3 inferior izquierdo              | <i>H. sapiens</i> |
| CA04/8/1    | incisivo 2 superior izquierdo      | <i>H. sapiens</i> |
| CA04/12/11  | incisivo 2 superior izquierdo      | <i>H. sapiens</i> |
| CA04/12/61  | No determinado                     | <i>H. sapiens</i> |
| CA04/3/41   | molar 3 superior izquierdo         | <i>H. sapiens</i> |
| CA04/12/58  | canino inferior derecho            | <i>H. sapiens</i> |
| CA04/11/32  | incisivo superior izquierdo        | <i>H. sapiens</i> |
| CA04/4/96   | molar 3 inferior izquierdo         | <i>H. sapiens</i> |
| CA04/8/16   | canino superior izquierdo          | <i>H. sapiens</i> |
| CA04/4/33   | molar 3 inferior izquierdo         | <i>H. sapiens</i> |
| RO19/2/1073 | fragmento diáfisis tibia izquierda | <i>H. sapiens</i> |
| RO19/2/1022 | fragmento diáfisis fémur           | <i>H. sapiens</i> |
| RO19/4/1409 | p3 inferior derecho                | <i>H. sapiens</i> |
| RO19/2/1068 | p4 inferior derecho                | <i>H. sapiens</i> |
| RO19/4/1385 | p3 inferior izquierdo              | <i>H. sapiens</i> |
| RO19/2/1064 | p4 superior derecho                | <i>H. sapiens</i> |
| RO19/2/1117 | p3 superior izquierdo              | <i>H. sapiens</i> |
| RO19/5/1370 | p3 inferior izquierdo              | <i>H. sapiens</i> |
| RO19/2/1065 | p3 superior izquierdo              | <i>H. sapiens</i> |
| RO19/2/1106 | fragmento diáfisis tibia           | <i>H. sapiens</i> |
| Ind.1/SXX/1 | p3 inferior izquierdo              | <i>H. sapiens</i> |
| Ind.1/SXX/2 | p4 inferior derecho                | <i>H. sapiens</i> |
| Ind.1/SXX/3 | incisivo inferior izquierdo        | <i>H. sapiens</i> |
| Ind.1/SXX/4 | molar 2 inferior izquierdo         | <i>H. sapiens</i> |
| Ind.2       | molar 3 inferior izquierdo         | <i>H. sapiens</i> |
| Ind.3       | molar 3 inferior izquierdo         | <i>H. sapiens</i> |
| Ind.4       | p4 superior izquierdo              | <i>H. sapiens</i> |

**Tabla 1.** Selección de muestras utilizadas. CA (Cova de les Agulles); RO (Roc de les Orenetes).

### 3.2 Preparación de muestras

La preparación de muestras atendió a las precauciones específicas para minimizar la contaminación siguiendo a Rohland y Hofreiter 2007; Barrio-Caballero 2013 y Paredes Herrera 2019. Las muestras se limpiaron primero, químicamente con hipoclorito de sodio al 10%, seguido de un enjuague con etanol al 70% y agua bidestilada estéril, y posteriormente mecánicamente eliminando la superficie con una herramienta *Dremmel*. . Todo el procedimiento se realizó en una cabina cerrada de flujo laminar equipada con filtros HEPA e iluminación UV en los laboratorios de la Facultad de Química de la URV. Para la limpieza de superficies mecánica y el corte de las raíces dentarias se siguieron las indicaciones del protocolo de ADN antiguo expuesto en Rohland y Hofreiter 2007. Del mismo modo, se esterilizaron los espacios de trabajo y herramientas antes de la irradiación UV durante 30 minutos antes de cada uso.

Se consideró para este trabajo separar corona y raíz de dientes para analizar únicamente la dentina. Esto es debido a las diferencias de composición entre ambos tejidos. No se puede homogeneizar esmalte y dentina conjuntamente, ya que existen diferencias tanto en el contenido orgánico como en la cristalinidad de ambos tejidos (ver apartado 1.2), produciendo un sesgo en el análisis de parámetros diagenéticos a través de ATR-FTIR. Así, se separó un fragmento de dentina para seguir el protocolo de homogeneización de tamaño de partícula apropiado para ATR-FTIR (ver apartado 3.3).

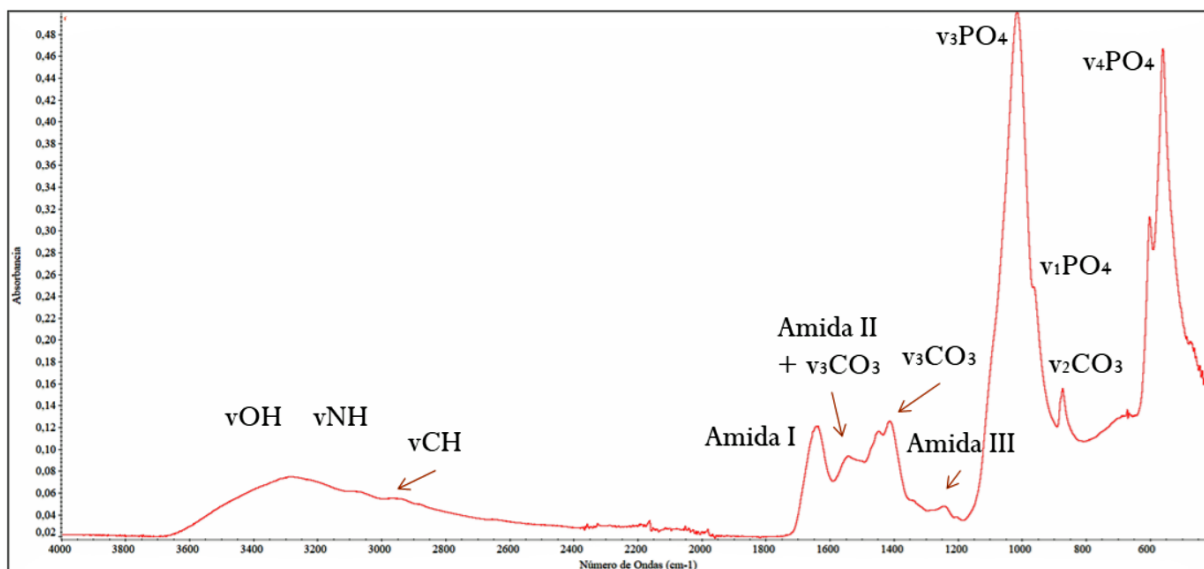
Para pulverizar las muestras destinadas a extraer ADN, se utilizó un molturador criogénico 6770 Freezer Mill en las instalaciones del Servicio de Biología del INTCF del Departamento de Barcelona, en colaboración con el Dr. Miguel Paredes Herrera. Se utilizaron viales de molienda con un bastidor metálico para obtener un polvo fino y homogéneo. Para evitar el sobrecalentamiento durante el procedimiento, se enfriaron los viales y muestras en nitrógeno líquido. A continuación las muestras se pulverizaron durante 2 minutos a 30 Hz. El polvo obtenido se transfirió a tubos Falcon de 15ml estériles para iniciar el protocolo de extracción de ADN (apartado 3.4.1).

### **3.3 Espectroscopía ATR-FTIR**

Los análisis se realizaron en el rango medio del espectro de luz infrarroja ( $4000-400\text{cm}^{-1}$ ), utilizado para estudiar las vibraciones fundamentales. El funcionamiento consiste en hacer incidir un rayo monocromo de luz infrarroja a través de una muestra para registrar la cantidad de energía absorbida. De este modo, existen dos formas de vibración de los enlaces: las vibraciones de elongación (*stretching*) y vibraciones de deformación (*bending*). Las vibraciones de elongación ( $\nu$ ) se producen en el interior del eje del enlace de dos átomos aumentando y disminuyendo la distancia interatómica, pueden ser simétricas o asimétricas. Las vibraciones de deformación ( $\delta$ ) también pueden ser simétricas o asimétricas pero, en cambio, se producen dentro o fuera del plano de los enlaces de los átomos, afectando a los ángulos (Farmer 1974).

Se ha elegido usar ATR-FTIR para muestras óseas tal y como se aconseja en Beasley et al. 2014, Lebon et al. 2016 y Kontopoulos et al. 2018. En estos trabajos se demuestra que en el análisis de la composición química de huesos es mejor utilizar ATR-FTIR, debido a que la preparación de muestra es menos laboriosa, se consigue una variación mínima entre espectros, lo que mejora la comparabilidad, se reducen los efectos del *grinding*, y la precisión alcanzada tras comparar los métodos ATR, Transmisión con pastillas de KBr y

DRIFT (transformada de Fourier infrarroja de reflectancia difusa) es mayor. En la Figura 5 se expone un espectro con las bandas que se observan para un diente actual.



**Figura 5.** Espectro ATR-FTIR de una dentina humana actual con la asignación de bandas.

Para la realización de las muestras se utilizó un espectrómetro modelo Jasco FT/IR-6800 disponible en los Servicios Científicos Técnicos de la URV (Tarragona). Se configuró con una resolución de  $2\text{cm}^{-1}$  y 64 scans en el rango  $4000\text{-}370\text{ cm}^{-1}$ . Las 27 muestras se prepararon siguiendo la metodología expuesta en Lebon et al. 2016 y Kontopoulos et al. 2018. Para ello se pulveriza la muestra en un mortero de ágata y se tamiza para seleccionar un tamaño de partícula comprendido entre  $50\text{-}60\mu\text{m}$  y  $20\mu\text{m}$ . Posteriormente, se utiliza  $\sim 1\text{mg}$  de hueso en polvo y se ajusta el yunque de presión de  $0.50$  a  $0.90\text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$  para alcanzar una absorbancia de  $0.5$  para la banda  $\text{v}_3\text{PO}_4$  a  $1015\text{cm}^{-1}$ . De esta manera, todos los espectros quedan normalizados a la misma absorbancia. Se realizan tres mediciones para cada muestra y se ajusta la línea base con 2 puntos para cada banda requerida. Después de cada medición se limpió la placa de cristal y el yunque de presión con alcohol isopropílico. Para el análisis de los espectros se utilizó el software Omnic 9.8, los parámetros utilizados se obtuvieron tras la corrección de la línea base (Tabla 2).

| Parámetro          | Picos  | Definición   | Modo vibracional                         | Línea base   | Referencia  |
|--------------------|--|--|--|--|---|
| Am/P               | 1640 cm <sup>-1</sup> /1010 cm <sup>-1</sup>                       | Relación entre Amida I y fosfatos                                      | Amida I C=O                              | 1720 cm <sup>-1</sup>                                | (Trueman et al. 2004)<br>(Lebon et al. 2016)  |
|                    |  |  |  | 1590 cm <sup>-1</sup>                                |   |
|                    |  |  | v <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> )        | 1150 cm <sup>-1</sup> -<br>890 cm <sup>-1</sup>      |   |
| IRSF               | (560 cm <sup>-1</sup> +600 cm <sup>-1</sup> )/590 cm <sup>-1</sup> | Indicador del orden y tamaño de la red cristalina                      | v <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> )        | 660/640 cm <sup>-1</sup><br>470/420 cm <sup>-1</sup> | (Weiner and Bar-Yosef 1990)   |
| C/P                | 1410 cm <sup>-1</sup> /1010 cm <sup>-1</sup>                       | Carbonatos respecto a fosfatos   | v <sub>3</sub> (CO <sub>3</sub> ) B-tipo | 1590 cm <sup>-1</sup> -<br>1290 cm <sup>-1</sup>     | (Wright and Schwarcz 1996)<br>(Sponheimer and Lee-Thorp 1999)<br>(Snoeck et al. 2014) |
| BPI                | 1410 cm <sup>-1</sup> /600 cm <sup>-1</sup>                        | Proporción relativa de carbonato tipo B                                |  |  | (Sponheimer and Lee-Thorp 1999)   |
| API                | 1540 cm <sup>-1</sup> /600 cm <sup>-1</sup>                        | Proporción relativa de carbonato tipo A                                | v <sub>3</sub> (CO <sub>3</sub> ) A-tipo | 1200 cm <sup>-1</sup> -<br>1800 cm <sup>-1</sup>     | (Sponheimer and Lee-Thorp 1999)   |
| C/C                | 1455 cm <sup>-1</sup> /1410 cm <sup>-1</sup>                       | Relación entre carbonatos A y B  | v <sub>3</sub> (CO <sub>3</sub> ) A-tipo | 1200 cm <sup>-1</sup> -<br>1800 cm <sup>-1</sup>     | (Thompson et al. 2009)  |
| 900/1035           | 872 cm <sup>-1</sup> /1010 cm <sup>-1</sup>                        | Relación entre carbonatos v <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) y fosfatos |  |  | (Thompson et al. 2013)<br>(Ellingham et al. 2016)                                     |
| AmI/C <sub>1</sub> | 1640 cm <sup>-1</sup> /1410 cm <sup>-1</sup>                       | Amida I respecto a carbonatos B  |  |  | (Kontopoulos et al. 2020)   |
| FWHM               |  | Anchura a media altura para v <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> )          |  | 1150 cm <sup>-1</sup> -<br>890 cm <sup>-1</sup>      | (Kimura-Suda and Ito 2017)<br>(Hollund 2013)  |
| AmIII/P            | 1270 cm <sup>-1</sup> /1010 cm <sup>-1</sup>                       | Amida III (α hélices) respecto a fosfatos                              | Amida III C-N                            | 1290 cm <sup>-1</sup> -<br>1210 cm <sup>-1</sup>     | (Chadefaux et al. 2009)<br>(Leskovar et al. 2020)                                     |
| AmI/C <sub>2</sub> | 1640 cm <sup>-1</sup> /872 cm <sup>-1</sup>                        | Amida I respecto a carbonatos B  | v <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) B-tipo | 830-890 cm <sup>-1</sup>                             | (Kontopoulos et al. 2020)   |

**Tabla 2.** Resumen de los parámetros utilizados en este trabajo y las líneas base utilizadas.

### 3.4 Análisis de ADN

#### 3.4.1 Extracción de ADN a partir de restos óseos

La extracción de ADN se ha realizado siguiendo el protocolo de extracción en hueso para el kit DNA IQ system, el cual proporciona una mayor eficiencia de recuperación en restos arqueológicos que otros métodos (Rohland y Hofreiter 2007b). Se ha podido comprobar que las técnicas de lisis más exitosas utilizan un quelante de metales divalentes, normalmente EDTA, detergentes iónicos (SDS) y disociación química (proteínasa K) para descomponer las matrices de las células. Además, los protocolos probados son más eficaces aplicando la extracción directa en polvo de hueso que realizando un paso de desmineralización, el cual puede conllevar la eliminación de moléculas de ADN (Paredes Herrera 2019).

En resumen, se incubaron 200-300mg de polvo de hueso cubriendo la muestra en solución de proteinasa K (PBS, proteinasa k) a 56°C durante 1 hora. La preparación de los reactivos se realizó siguiendo el protocolo DNA IQ system diseñado para muestras óseas, utilizando 15µl de resina paramagnética y 40µl de tampón de elución para obtener la concentración final de la muestra.

### 3.4.2 Cuantificación por Q-PCR

La cuantificación de ADN se realizó a través de PCR a tiempo real siguiendo el protocolo descrito en Quantifiler® Human DNA Standard. Para obtener la concentración se realizó una recta estándar con una serie de diluciones estándar con concentraciones desde 50 ng / µL (Estándar 1) a 0.023 ng / µL, o 23 pg / µL (Estándar 8) que se amplificaron en reacciones duplicadas en la misma placa que las muestras desconocidas. En el proceso de cuantificación se minimizó la posibilidad de contaminación durante el análisis de ADN, implementando controles negativos en la reacción de amplificación Así se obtuvo la siguiente recta estándar:

| Standard         | Concentración ng/µl |
|------------------|---------------------|
| 0,0              | 0,0009              |
| 0,0              | 0,0311              |
| 0,0              | 0,0311              |
| 0,1              | 0,0683              |
| 0,1              | 0,0683              |
| 0,2              | 0,1219              |
| 0,2              | 0,1219              |
| 0,6              | 0,7395              |
| 0,6              | 0,7395              |
| 1,9              | 1,6260              |
| 1,9              | 1,6260              |
| 5,6              | 7,4380              |
| 5,6              | 7,4380              |
| 16,7             | 16,3600             |
| 16,7             | 16,3600             |
| 50,0             | 55,8100             |
| 50,0             | 55,8100             |
| Control negativo | -                   |

### 3.5 Análisis estadístico

Primeramente, se realizó una visualización de las variables a través de diagramas de cajas de los parámetros extraídos a partir de los espectros normalizados. Se realizó un test ANOVA (sin asumir igualdad de varianzas, Test de Dunnet) para evaluar si las diferencias entre las medias de los conjuntos son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Cada parámetro (Tabla 2) se relaciona con un aspecto orgánico o inorgánico de los restos óseos.

Para observar la distribución de las variables y cuál es su aportación a esta distribución, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Siguiendo a Smith et al. 2007, este PCA permite observar qué restos están mejor preservados y si hay características comunes en los conjuntos utilizados.

El primer paso a la hora de establecer un modelo lineal múltiple es estudiar la relación que existe entre variables. Esta información es crítica a la hora de identificar cuáles pueden ser los mejores predictores para el modelo. Se utilizó la correlación de Spearman para determinar si había correlaciones entre cualquiera de los 11 parámetros y la cantidad de ADN extraído de la muestra. Elegimos la correlación de Spearman, ya que nuestras variables pueden cambiar al mismo tiempo, pero no necesariamente a un ritmo constante, además somos conscientes con la limitación del número de muestras y su distribución no normal.

Posteriormente, en la búsqueda de los parámetros que permitieran diferenciar entre muestras con mayor potencial para una extracción de ADN exitosa, se realizó una Regresión Lineal Múltiple. Para llevar a cabo los análisis se utilizaron los programas R 1.1.453 y SPSS v. 20.0.

## **4. Resultados**

En el Anexo 1 se exponen los resultados obtenidos para cada parámetro, así como, las desviaciones estándar y la cuantificación de ADN de los conjuntos de muestras analizados.

### **4.1. ATR-FTIR**

Los parámetros analizados muestran valores distintos para cada conjunto de muestras. En las Figuras 6 y 7, se observan los diagramas de cajas obtenidos para los parámetros diagenéticos.

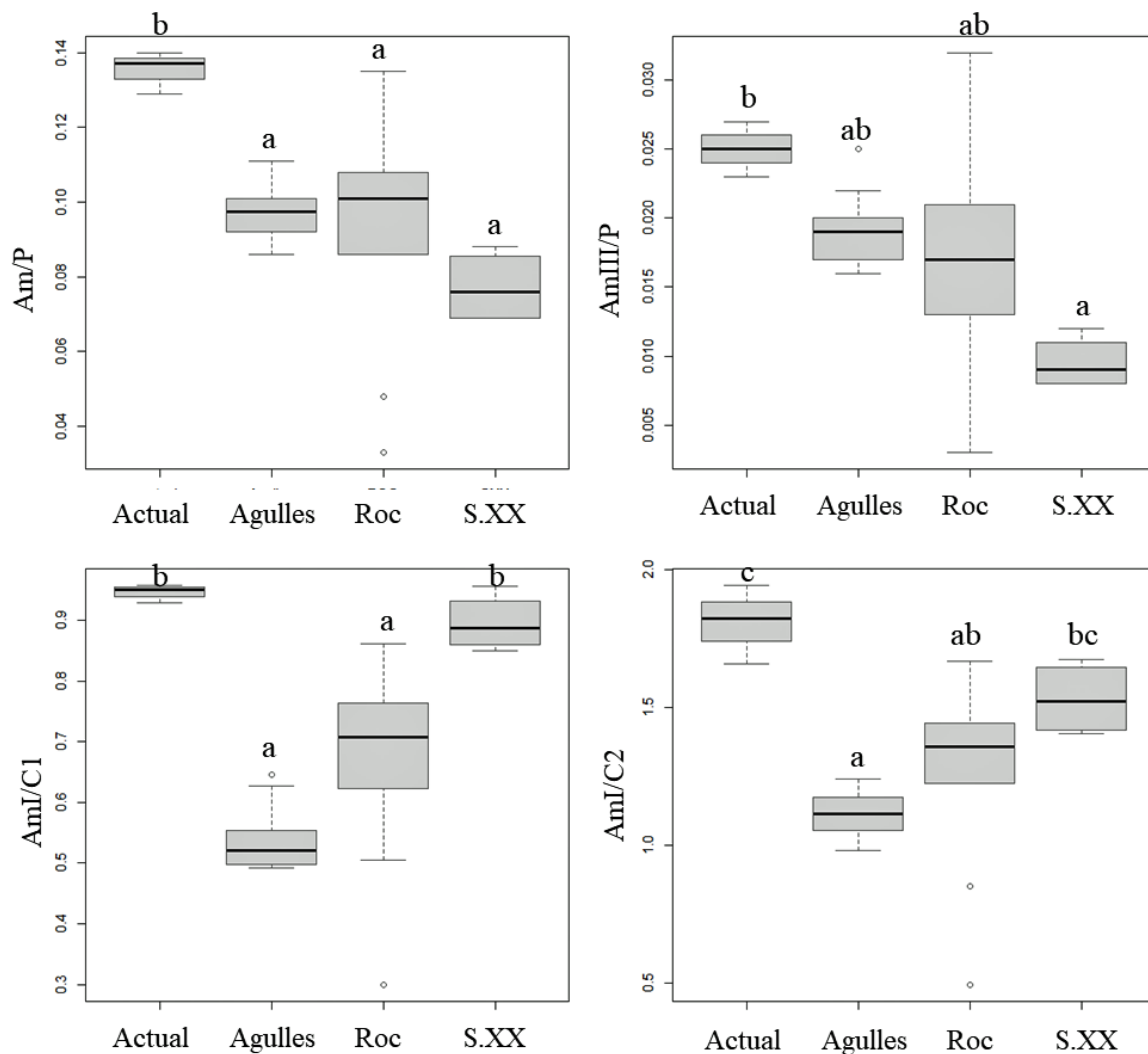
Las muestras de los individuos 2, 3 y 4 representan los valores de las dentinas actuales. Tanto los valores sobre la fracción orgánica como la fracción inorgánica muestran valores de buena preservación (France et al. 2020). Así, se obtuvieron valores comprendidos entre 0.129 y 0.140 para la relación entre la amida I y los fosfatos (Am/P) y entre 0.023 y 0.027 para la relación entre amida III y fosfatos (AmIII/P), los cuales son relativos al colágeno y agua preservada en la estructura ósea. Aplicando el método de Lebon et al. 2016 se puede observar que las muestras conservan en torno al 17% de colágeno en relación a un 3% de

nitrógeno (Anexo 1) en peso (individuo 2: 16.29 wt% Coll y 3 wt% N; individuo 3: 17.49wt% Coll y 3.19 wt% N; individuo 4: 17.14 wt% col y 3.12 wt% N). Los valores del Infrared splitting factor (IRSF) o índice de cristalinidad se conservan entre 3.32 y 3.37 con un Full width at half maximum (FWHM) entre 96.43 y 110.038. En cuanto a los valores relativos a los carbonatos, la relación entre carbonatos y fosfatos (C/P) se encuentra entre 0.189 y 0.222, para los carbonatos B-Tipo (BPI) obtenemos valores entre 0.43 y 0.488 y para los carbonatos A-tipo (API) entre 0.401 y 0.472. Para C/C o relación entre carbonatos A-tipo y B-tipo se han obtenido valores entre 0.760 y 0.844 y para la relación 900/1035 entre 0.1 y 0.113. Recordemos que los carbonatos en las posiciones B son los carbonatos dominantes en la formación de las bioapatitas, mientras que las posiciones A son dominantes en los minerales de apatito no fisiológicos, por lo que obtener sus relaciones nos permite evaluar tanto el estado de fosilización como la buena preservación de la apatita biológica (Madupalli et al. 2017). Finalmente, para los índices AmI/C<sub>1</sub> se obtuvieron valores entre 0.928 y 0.958 y para AmI/C<sub>2</sub> entre 1.656 y 1.943. Estos índices fueron propuestos por Kontopoulos et al. 2020 para relacionar la parte mineral y orgánica de ambas posiciones de los carbonatos B y la Amida I.

Para las dentinas medidas del individuo 1, se obtuvieron valores para Am/P entre 0.069 y 0.088 y para AmIII/P entre 0.008 y 0.012. Estos valores corresponden a una media de 10.43 wt% de colágeno y 1.90 wt% de N. Para el IRSF se obtuvo valores entre 4.36 y 4.59 y FWHM entre 75.352 y 92.339. La cristalinidad muestra una bioapatita deteriorada con valores de mala preservación (France et al., 2020). En cuanto a los carbonatos se obtuvieron valores entre 0.118 y 0.149 para C/P, entre 0.247 y 0.553 para BPI y entre 0.219 y 0.525 para API. En cuanto a C/C se obtuvieron valores entre 0.898 y 0.965 y para 900/1035 entre 0.072 y 0.081. Finalmente, se obtuvo entre 0.849 y 0.956 para AmI/C<sub>1</sub> y entre 1.405 y 1.672 para AmI/C<sub>2</sub>. Estos valores muestran unas dentinas medianamente deterioradas en cuanto a la fracción mineral, a pesar de mantener valores orgánicos relativamente buenos.

Para el conjunto del Roc de les Orenetes se han obtenido valores diferentes para las dentinas y los restos apendiculares (RO19/2/1073, RO19/2/1022 y RO19/2/1106). Así en las dentinas se obtuvo para Am/P valores entre 0.086 y 0.112 y para AmIII/P entre 0.013 y 0.024 que corresponde a una media de 13.15 wt% de colágeno en relación a 2.40 wt% de N. Para el IRSF se obtuvo entre 3.586 y 3.775 y para el FWHM entre 75.339 y 93.716. Para C/P entre 0.168 y 0.249, para BPI entre 0.384 y 0.569 y para API entre 0.310 y 0.389.

En cuanto a C/C se obtuvieron valores entre 0.749 y 0.806, para 900/1035 entre 0.089 y 0.127. Para AmI/C<sub>1</sub> se obtuvo entre 0.683 y 0.861 y para AmI/C<sub>2</sub> entre 1.341 y 1.667.

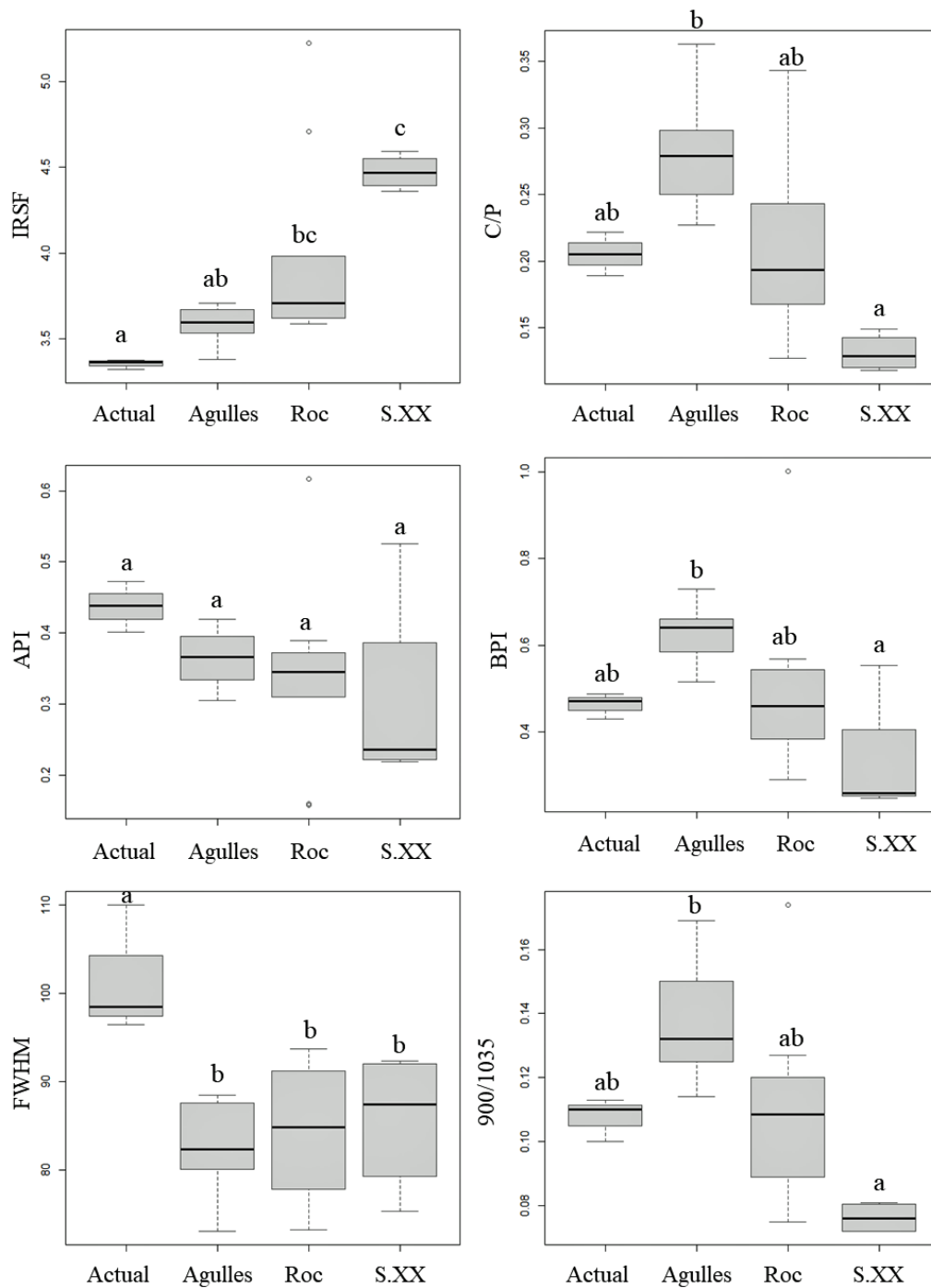


**Figura 6.** Distribución de los parámetros diagenéticos que relacionan Amida I/ $\nu_3(\text{PO}_4)$  (Am/P), Amida III/ $\nu_3(\text{PO}_4)$  (AmIII/P), Amida I/ $\nu_3(\text{CO}_3)$  (AmI/C<sub>1</sub>) y Amida I/ $\nu_2(\text{CO}_3)$  (AmI/C<sub>2</sub>) calculados por ATR-FTIR para cada conjunto de muestras. Diferentes letras para cada parámetro indicarían diferencias significativas entre los contextos analizados ( $p < 0,05$ ), utilizando el test ANOVA.

En cuanto a los elementos apendiculares los valores cambian drásticamente (ver Anexo 1). Se obtuvieron valores entre 0.033 y 0.135 para Am/P y 0.003 y 0.032 para AmIII/P. En cuanto a la cristalinidad se aleja mucho de los valores del hueso moderno, evidenciando una mala preservación del mineral entre 3.98 y 5.224 para IRSF. En cuanto al FWHM se obtuvieron valores entre 73.189 y 82.019. Para los carbonatos, la relación C/P se dio entre 0.139 y 0.343, para BPI entre 0.291 y 1.002 y para API entre 0.158 y 0.617. En cuanto a C/C se obtuvo entre 0.836 y 1.072, mientras que para 900/1035 se obtuvo entre 0.084 y 0.174. Finalmente, para AmI/C<sub>1</sub> entre 0.299 y 0.623 y para AmI/C<sub>2</sub> entre 0.494 y 1.225.

Se puede observar una conservación diferencial del tejido óseo en este yacimiento, estando en valores de buena preservación las dentinas óseas y en valores de mala preservación los restos postcraneales. De hecho, el fragmento diafisario de fémur RO19/2/1022 está altamente deteriorado y enriquecido en iones de  $\text{CO}_3^{2-}$  a diferencia de los fragmentos de tibia.

Finalmente, el conjunto de dentinas de la Cova de les Agulles se obtuvieron valores entre 0.086 y 0.111 para Am/P y entre 0.016 y 0.025 para AmIII/P. Estos valores corresponden a una media de 12.46 wt% de colágeno en relación a 2.3 wt% N. Los valores de IRSF se encuentran entre 3.38 y 3.7 con un FWHM entre 73.043 y 88.495. En cuanto a los carbonatos se obtuvieron valores para C/P entre 0.227 y 0.363, para BPI entre 0.515 y 0.73 para API entre 0.305 y 0.419. En cuanto a C/C entre 0.742 y 0.903 y para 900/1035 entre 0.114 y 0.169. Los valores de AmI/C1 se obtuvieron entre 0.492 y 0.645 y para AmI/C2 entre 0.98 y 1.239. Es decir, se obtienen valores de buena preservación en cuanto a cristalinidad y fracción orgánica. No obstante, se observa un enriquecimiento de  $\text{CO}_3^{2-}$  sobre todo en la posición  $1410\text{cm}^{-1}$  (C/P y BPI), absorbancia principal en el espectro de la calcita ( $\text{CaCO}_3$ ).



**Figura 7.** Boxplot con la distribución de frecuencias de los parámetros diagenéticos obtenidos por ATR-FTIR. IRSF o índice de cristalinidad; C/P que relaciona  $\nu_3(\text{CO}_3)/\nu_3(\text{PO}_4)$ ; API,  $\nu_3(\text{CO}_3)/\nu_4(\text{PO}_4)$ ; BPI,  $\nu_3(\text{CO}_3)/\nu_4(\text{PO}_4)$ ; FWHM para  $\nu_3(\text{PO}_4)$ ; 900/1035,  $\nu_2(\text{CO}_3)/\nu_3(\text{PO}_4)$ . Diferentes letras para cada parámetro indicarían diferencias significativas entre los contextos analizados ( $p < 0,05$ ), utilizando el test ANOVA.

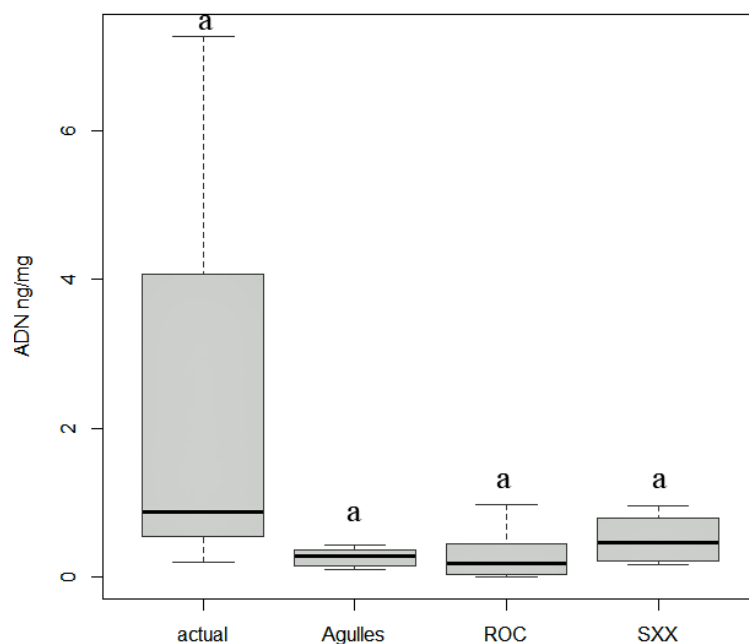
## 4.2. Cuantificación de ADN

Los resultados de la cuantificación son los promedios de los duplicados de las muestras de dentina y hueso. La concentración se expresó en ng de ADN por  $\mu\text{l}$  de extracto, multiplicando posteriormente el resultado por 40  $\mu\text{l}$  y normalizado por los mg de hueso

utilizado. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos. El umbral para  $r^2$  se fijó en 0,98 con una pendiente de -3.3, encontrándose en el rango recomendado entre -2.9 y -3.3. En el proceso de cuantificación se minimizó la posibilidad de contaminación durante el análisis de ADN, implementando controles negativos en la reacción de amplificación. En cuanto al individuo 2, se excluyó del análisis de regresión lineal múltiple al ser identificado como outlayer dentro de las muestras (Figura 9). Los resultados indican que la concentración de ADN es más alta en las muestras actuales. Sin embargo, al normalizar los datos por la cantidad de material de partida (mg de hueso) estas diferencias no se observan, aunque sí parecería que en las muestras modernas la cantidad de ADN es mayor como cabría esperar (Tabla 3).

| Referencia  | ADN ng/ $\mu$ l | Promedio en cada contexto $\pm$ error típico | ADN ng/mg hueso | Promedio en cada contexto $\pm$ error típico |
|-------------|-----------------|--|-----------------|--|
| CA04/11/30  | 0,0021          | 0.002 $\pm$ 0.0003a                          | 0,314           | 0.258 $\pm$ 0.037a                           |
| CA04/8/1    | 0,0034          |  | 0,425           |  |
| CA04/12/11  | 0,0008          |  | 0,094           |  |
| CA04/12/61  | 0,0022          |  | 0,297           |  |
| CA04/3/41   | 0,0018          |  | 0,246           |  |
| CA04/12/58  | 0,0009          |  | 0,109           |  |
| CA04/11/32  | 0,0014          |  | 0,203           |  |
| CA04/4/96   | 0,0011          |  | 0,154           |  |
| CA04/8/16   | 0,003           |  | 0,384           |  |
| CA04/4/33   | 0,0029          |  | 0,356           |  |
| RO19/2/1073 | 0,0006          | 0.002 $\pm$ 0.0005a                          | 0,024           | 0.280 $\pm$ 0.095a                           |
| RO19/2/1022 | 0,0011          |  | 0,036           |  |
| RO19/4/1409 | 0,0000          |  | 0,000           |  |
| RO19/2/1068 | 0,0008          |  | 0,123           |  |
| RO19/4/1385 | 0,003           |  | 0,406           |  |
| RO19/2/1064 | 0,0026          |  | 0,448           |  |
| RO19/2/1117 | 0,0007          |  | 0,099           |  |
| RO19/5/1370 | 0,0053          |  | 0,977           |  |
| RO19/2/1065 | 0,0024          |  | 0,453           |  |
| RO19/2/1106 | 0,0019          |  | 0,237           |  |
| Ind.1/SXX/1 | 0,004           | 0.003 $\pm$ 0.0010a                          | 0,635           | 0.505 $\pm$ 0.178a                           |
| Ind.1/SXX/2 | 0,0018          |  | 0,274           |  |
| Ind.1/SXX/3 | 0,001           |  | 0,166           |  |
| Ind.1/SXX/4 | 0,0054          |  | 0,948           |  |
| Ind.2       | 0,1952          | 0.014 $\pm$ 0.009b                           | 7,266           | 0.535 $\pm$ 0.337a                           |
| Ind.3       | 0,0053          |  | 0,199           |  |
| Ind.4       | 0,0225          |  | 0,873           |  |

**Tabla 3-** ADN obtenido para cada muestra. Diferentes letras para cada parámetro indicarían diferencias significativas entre los contextos analizados ( $p < 0,05$ ), utilizando el test ANOVA.



**Figura 8.** Boxplot que reflejan los contenidos obtenidos de ADN ng/mg de hueso para cada conjunto de muestras.

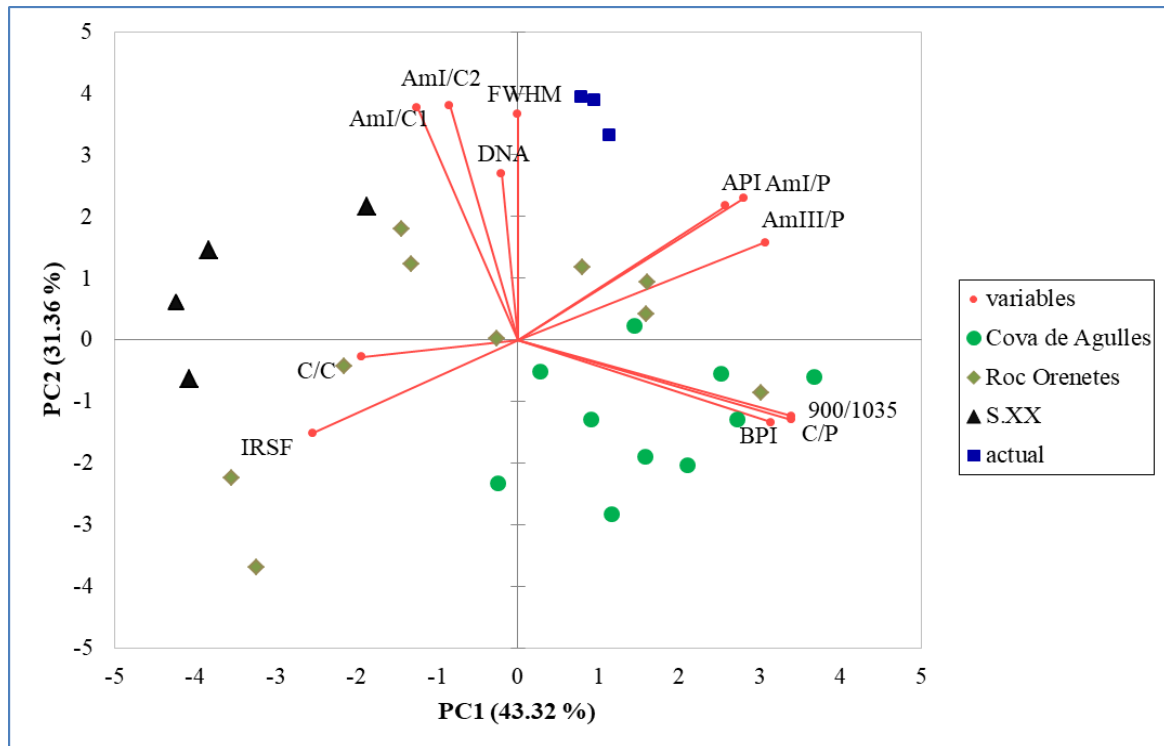
### 4.3 Análisis estadístico PCA, Correlaciones y Regresión lineal múltiple

El análisis de componentes principales (PCA) explicó el 74.68% de la varianza a través de 2 componentes principales (Fig.9 y Tabla 4). Podemos observar, que las muestras tienden a agruparse según su contexto. Las muestras arqueológicas de Cova de les Agulles se agrupan homogéneamente viéndose afectadas por las variables relativas a carbonatos B-tipo (BPI, C/P, 900/1035). En cuanto a las muestras del Roc de les Orenetes quedan distribuidas de forma heterogénea, viéndose afectadas por las variables de contenido orgánico (Am/P, AmIII/P) y API. Las tres muestras de elementos apendiculares quedan desplazadas por las variables del índice de cristalinidad (IRSF). Así, se observa que los parámetros diagenéticos son más complejos en el Roc de les Orenetes, afectando de forma diferente a la preservación de dentinas y huesos.

Las muestras del individuo 1 se ven desplazadas afectadas por un aumento del IRSF. El grupo creado por las muestras actuales (ind.2, 3, 4) nos indica el área en el espacio de los componentes con mayor contenido orgánico y cristalinidad bien preservada (FWHM, IRSF). Podemos extraer que las variables relacionadas con la variable ADN son AmI/C<sub>1</sub>, AmI/C<sub>2</sub> y FWHM.

|                               | PC1    | PC2    | PC3    | PC4    | PC5    | PC6    | PC7    | PC8    | PC9    | PC10   | PC11   | PC12    |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| <b>Varianza (%)</b>           | 43,321 | 31,358 | 8,359  | 7,538  | 3,647  | 2,427  | 1,401  | 1,080  | 0,430  | 0,269  | 0,144  | 0,025   |
| <b>Varianza acumulada (%)</b> | 43,321 | 74,679 | 83,038 | 90,576 | 94,223 | 96,650 | 98,051 | 99,131 | 99,562 | 99,831 | 99,975 | 100,000 |

**Tabla 4.** Explicación de la varianza en cada componente principal.



**Figura 9.** PCA con la distribución de los conjuntos de muestras y la contribución de las variables analizadas.

El análisis de correlaciones (Fig. 10) nos permitió evaluar la relación de los parámetros de forma independiente y entender la relación de cada uno con el contenido de ADN. La correlación de Spearman utilizada destacó correlaciones significativas entre los parámetros diagenéticos. IRSF se correlaciona con las variables relativas al contenido de colágeno de forma negativa ( $Am/P \sim IRSF$   $r^2 = -0.666$ ,  $AmIII/P \sim IRSF$   $r^2 = -0.625$ ), es decir, a mayor cristalinidad menor contenido de proteínas colágenas. Del mismo modo, las variables de carbonatos están fuertemente correlacionadas entre ellas (BPI, CP, 900/1035) a excepción de API y C/C.

En cuanto a la variable de contenido de ADN, destacamos 3 parámetros. Con un coeficiente de correlación bajo y no significativo  $AmI/C_1$  ( $r^2 = 0.355$ ) y  $AmI/C_2$  ( $r^2 = 0.328$ ) y el parámetro FWHM con coeficiente de correlación más alto ( $r^2 = 0.732$ ,  $p < 0.001$ ) (ver

Fig.10 y Anexo 1). Estos valores se obtienen al extraer como outlier al individuo 2, ya que sobreestimaba el test.

A partir de las variables que estaban más asociadas con el contenido de ADN (FWHM, AmI/C<sub>1</sub> y AmI/C<sub>2</sub>) se realizó un modelo predictivo mediante regresión lineal múltiple, obteniendo como variable dependiente en el mejor modelo el parámetro FWHM (Modelo 3). No obstante, se deben atender al resto de parámetros y en especial a IRSF, C/P, Am/P AmI/C<sub>1</sub> y AmI/C<sub>2</sub> para poder caracterizar una buena preservación del material óseo en general. Los resultados de los modelos predictivos fueron los siguientes.

| Modelo             | Coeficientes no estandarizados |       | Coeficientes tipificados | P-valor | Intervalo de confianza de 95.0% para B |                 |
|--------------------|--------------------------------|-------|--------------------------|---------|--|-----------------|
|                    | B<br>Error típ.                |       | Beta                     |         | Límite inferior                        | Límite superior |
| 1 (Constante)      | -1,763                         | 0,501 |                          | 0,002   | -2,803                                 | -0,724          |
| AmI/C <sub>1</sub> | 0,024                          | 0,669 | 0,016                    | 0,972   | -1,364                                 | 1,411           |
| FWHM               | 0,023                          | 0,007 | 0,636                    | 0,004   | 0,008                                  | 0,038           |
| AmI/C <sub>2</sub> | 0,080                          | 0,401 | 0,089                    | 0,845   | -0,752                                 | 0,911           |
| 2 (Constante)      | -1,766                         | 0,483 |                          | 0,001   | -2,765                                 | -0,767          |
| FWHM               | 0,023                          | 0,007 | 0,637                    | 0,003   | 0,009                                  | 0,037           |
| AmI/C <sub>2</sub> | 0,092                          | 0,171 | 0,103                    | 0,594   | -0,261                                 | 0,446           |
| 3 (Constante)      | -1,848                         | 0,452 |                          | <0,001  | -2,781                                 | -0,915          |
| FWHM               | 0,026                          | 0,005 | 0,702                    | <0,001  | 0,015                                  | 0,036           |

**Tabla 5.** Modelos predictivo y coeficientes obtenidos.

El modelo 3 con la variable FWHM de los espectros normalizados es capaz de explicar el 70% de la varianza observada en la cantidad de ADN ng/mg. El test F muestra que es significativo (p-value: 6,450e-05). Así la concentración de ADN puede ser calculada a través de FWHM con un error típico  $\pm 0.005$  y  $R^2$ : 0.702 a través de la siguiente ecuación:

$$\text{ADN ng/mg} = 0.026 * \text{FWHM} - 1.848$$

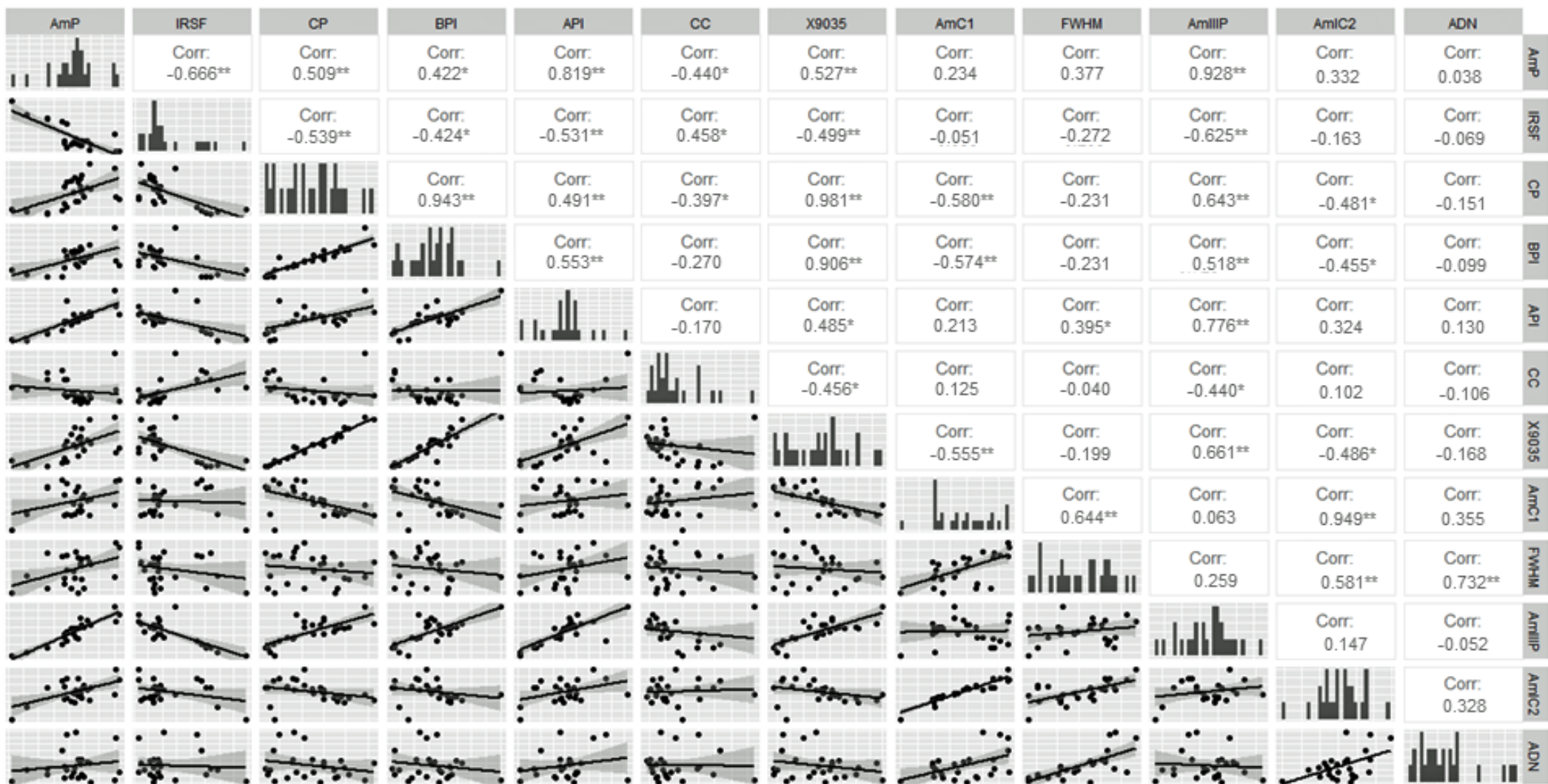


Figura 10- Matriz de correlaciones para todos los parametros diagenéticos calculados a partir de los espectros normalizados por ATR-FTIR y ADN ng/mg hueso.

## 5. Discusión

El análisis de ADN es un análisis muy recurrente tanto para el ámbito arqueológico como forense y es importante asegurarse la obtención de un producto adecuado, sobre todo, cuando las muestras son escasas o están en mal estado de conservación. Sin embargo, la supervivencia del ADN está sujeta a multitud de variables tras la muerte del individuo. Debido al costoso procedimiento, la necesidad de recursos, el tiempo y el carácter destructivo del análisis de ADN en restos óseos, es necesario explorar técnicas rápidas y económicas para la preselección de muestras. Además debemos profundizar en el conocimiento de los ambientes y contextos en relación a la preservación de ADN.

A través de 11 parámetros hemos evaluado el estado de conservación de los diferentes conjuntos arqueológicos, las muestras del individuo 1 del siglo XX y 3 muestras actuales. Así, el conjunto más antiguo, Cova de les Agulles, ha proporcionado información sobre la conservación en un ambiente cárstico, donde los parámetros han indicado un enriquecimiento en  $\text{CO}_3^{2-}$ . Por otro lado, el Roc de les Orenetes, ha permitido evaluar que los tejidos postcraneales se han conservado peor que las dentinas y que a pesar de ser un ambiente cárstico no resulta tan favorable al enriquecimiento en los huesos de iones de  $\text{CO}_3^{2-}$  como se observa en la Cova de les Agulles. Finalmente, las muestras del individuo 1 del s.XX, muestran una mala preservación de los valores, especialmente los inorgánicos (IRSF, C/P, 900/1035). Los resultados indican que los dos conjuntos arqueológicos no difieren estadísticamente en sus parámetros. Así, deducimos que los ambientes de cueva (Tafosistema de cueva) pueden conllevar procesos diagenéticos comunes. En ambos casos, hay un aumento de los valores de carbonato, en concreto tipo B. Mientras que API refleja que los 4 conjuntos no están en un estado avanzado de fosilización, al no predominar los carbonatos tipo-A, que controlan las propiedades de minerales apatíticos en medios no fisiológicos (Madupalli et al. 2017). El índice de cristalinidad IRSF en cambio ofrece valores propios para cada conjunto, observando que el Roc de les Orenetes se encuentra en un medio más agresivo que el conjunto de la Cova de les Agulles, que a su vez se acerca a los valores de las dentinas actuales. Estas diferencias evidencian la necesidad de evaluar los contextos forenses y arqueológicos tafonómicamente, ya que el ambiente de deposición influirá en su preservación y de ello dependerá el éxito de las extracciones de ADN o proteínas como colágeno. Se evidencia así, la necesidad de evaluar cada muestra individualmente al menos con los parámetros propuestos en este trabajo.

En nuestro caso, no hemos encontrado una relación clara entre el índice de cristalinidad (IRSF) y el contenido de colágeno (Am/P, AmIII/P) con la cantidad de ADN. No obstante, en otros trabajos como Kontopoulos et al. 2020 y Leskovar et al. 2020 se han propuesto estos índices junto a C/P como indicadores predictivos tras el tratamiento del producto de ADN como % de ADN endógeno. Aunque en nuestro caso no hemos obtenido una relación clara con la variable ADN ng/mg, sí hemos obtenido una fuerte correlación entre las variables IRSF, C/P, API, Am/P y AmIII/P (Fig.10) que nos permite afirmar una dependencia entre la cristalinidad, el contenido de colágeno y los carbonatos. A su vez, y coincidiendo con Kontopoulos et al. 2020, hemos podido ver una tendencia de asociación entre AmI/C<sub>1</sub> y AmI/C<sub>2</sub> y el contenido de ADN. Es decir, sí encontramos una relación entre el colágeno y los carbonatos del hueso con el contenido de ADN, pero la relación parece ser compleja como mostraron Mrevlishvili y Svintradze 2005 y Kontopoulos et al. 2019.

En cuanto al valor de FWHM para el pico principal del contenido de fosfatos  $\nu_3(\text{PO}_4)$  se ha obtenido una buena correlación con ADN ng/mg. Este parámetro es relativo a la estabilidad de la red cristalina y, tras normalizar los espectros, se da como una buena variable predictiva. Si bien es cierto, que en trabajos futuros debe validarse el método y aplicarse en un mismo contexto, ya que puede producirse una sobrestimación entre muestras bien preservadas respecto a mal preservadas. No obstante, los resultados preliminares que aquí exponemos son prometedores en la búsqueda de una evaluación rápida de muestras para análisis de ADN. El uso de FWHM como parámetro exploratorio ha sido poco aplicado en la bibliografía actual (Hollund 2013), usándose más como parámetro comparativo entre métodos de preparación de muestras y comparación entre técnicas (Surovell and Stiner 2001; Kimura-Suda and Ito 2017; Kontopoulos et al. 2018). No obstante, puede ser un parámetro que recoja suficiente información al analizar el ancho de banda del pico principal de fosfatos  $\nu_3(\text{PO}_4)$ , siendo una medida sensible a la alteración del conjunto de grupos fosfatos. Del mismo modo, actualmente está siendo relevante la aplicación de *machine learning*. Según Chowdhury et al. 2021, puede mejorar la precisión en el cribado de muestras con los parámetros de ATR-FTIR, tanto para evaluación de proteínas como para análisis de ADN. Consideramos que la exploración de parámetros diagenéticos en este sentido debe continuar y para ello debemos trabajar en obtener parámetros prometedores y testarlos en diferentes contextos, ya sean forenses o arqueológicos.

## 6. Conclusiones

Este trabajo propone la utilización de ATR-FTIR para analizar muestras óseas forenses y arqueológicas. Se han evaluado 11 parámetros comúnmente utilizados para evaluar el estado de preservación de los huesos (Am/P, IRSF, C/P, BPI, API, C/C, 900/1035, AmI/C<sub>1</sub>, FWHM, AmIII/P, AmI/C<sub>2</sub>) obteniendo las siguientes conclusiones:

- La información bioquímica obtenida es diferente para cada conjunto de muestras. Es decir, diferentes contextos han ofrecido diferentes valores. Destacamos la necesidad de atender al tipo de contexto en escenas forenses y arqueológicas previo a realizar las analíticas.
- FWHM ha resultado ser la variable predictiva más relevante en nuestro conjunto y se propone un modelo predictivo potente, que sirva de parámetro evaluativo en la decisión de futuras extracciones de ADN en restos óseos.
- Am/C<sub>1</sub>, Am/C<sub>2</sub> y FWHM deben ser considerados como variables a tener en cuenta en el cribado de muestras para ADN a través de este método.
- No se ha detectado una relación directa entre las frecuencias de amida I y amida III y la preservación de ADN en nuestra muestra.
- La cantidad de ADN extraída no es significativamente superior en las muestras modernas respecto a las antiguas. Sin embargo, las muestras modernas analizadas son pocas y no se ha realizado un análisis de calidad del ADN, que sí podría ser diferente a pesar de que la cantidad de ADN no varíe.
- ATR-FTIR es una herramienta rápida, económica y válida para la optimización de muestras de hueso y diente.

## 7. Perspectivas de futuro y aplicabilidad

Se ha puesto a punto una metodología de extracción de ADN en hueso en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la URV con una metodología de preselección de muestras. Como perspectivas futuras debemos validar el método, obteniendo las secuencias genéticas, que no ha sido posible para este TFM debido a limitaciones de tiempo y los recursos. La aplicabilidad de la técnica para huesos modernos es adecuada, aunque para hueso antiguo debe ser reproducida y validada al menos por 3 laboratorios con acreditación para realizar extracción de ADN antiguo. A pesar de ser un trabajo preliminar, se han explorado vías de investigación en preservación de biomoléculas antiguas. Se ha evaluado una técnica útil para evaluar el potencial de muestras forenses o arqueológicas de forma rápida y económica con los recursos disponibles en la Universitat Rovira i Virgili (URV) y en el Institut Català de Paleoecologia Humana i Evolució Social (IPHES).

## 8. Bibliografía

- Barrientos G, Sarmiento P, Galligani P (2016) Evaluación De La Diagénesis Ósea Mediante El Uso De Microscopía Electrónica De Barrido (Meb): Aproximaciones Analíticas Aplicables a Muestras Arqueológicas. *Rev Argentina Antropol Biológica* 18:. <https://doi.org/10.17139/raab.2016.0018.02.03>
- Barrio-Caballero PA (2013) Revision of DNA extraction methods from bone fragments in forensic laboratories. *Rev Esp Med Leg* 39:54–62. <https://doi.org/10.1016/j.reml.2012.11.002>
- Beasley MM, Bartelink EJ, Taylor L, Miller RM (2014) Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: Implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. *J Archaeol Sci* 46:16–22. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.03.008>
- Bernabéu Martínez E, López-Oliva Muñoz F, Larena Pellejero a., et al (2006) Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados Bone composition study for an appropriate regeneration with implanted materials. *Fund Mapfre* 4:202–207
- Bobroff V, Chen HH, Javerzat S, Petibois C (2016) What can infrared spectroscopy do for characterizing organic remnant in fossils? *TrAC - Trends Anal Chem* 82:443–456. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.005>
- Butler JM (2005) Chapter 10: Mitochondrial DNA Analysis. In: *Forensic DNA Typing: Biology, technology and genetics of str markers*. Academic Press
- Chadefaux 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* 129–137
- Chowdhury MP, Choudhury KD, Bouchard GP, et al (2021) Machine learning ATR-FTIR spectroscopy data for the screening of collagen for ZooMS analysis and mtDNA in archaeological bone. *J Archaeol Sci* 126:105311. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2020.105311>
- Collins MJ, Nielsen-Marsh CM, Hiller J, et al (2002) The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry* 44:383–394. <https://doi.org/10.1111/1475-4754.t01-1-00071>
- Collins MJ, Penkman KEH, Rohland N, et al (2009) Is amino acid racemization a useful tool for screening for ancient DNA in bone? *Proc R Soc B Biol Sci* 2971–2977. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0563>
- Currey J (2004) Incompatible mechanical properties in compact bone. *J Theor Biol* 231:569–580. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.07.013>
- Currey JD (2012) The structure and mechanics of bone. *J Mater Sci* 47:41–54. <https://doi.org/10.1007/s10853-011-5914-9>
- Del Valle H, Cáceres I (2020) Los efectos del hervido en la microestructura ósea. Estado de la cuestión y enfoques metodológicos para su caracterización en el registro arqueológico. *ArqueoGazte Rev Arqueol Aldizkaria* 10:261–275
- Dominguez Rodrigo, M., Fernández-López S, Alcalá L (2011) How can taphonomy be defined in the XXI century? *J Taphon* 9:1–13
- Ellingham STD, Thompson TJU, Islam M (2016) The Effect of Soft Tissue on Temperature Estimation from Burnt Bone Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Forensic Sci* 61:153–159. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12855>
- Eriksen AMH, Matthiesen H, Kontopoulos I, et al (2020) Rapid loss of endogenous DNA in pig bone buried in five different environments. *Archaeometry* 1–20. <https://doi.org/10.1111/arcm.12553>
- Farmer VC (1974) *The infrared spectra of minerals*. Mineralogical Society, London
- Fernández Domínguez E (2005). *Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea*, Universitat de Barcelona
- Fernández-Jalvo Y, Andrews P, Pesquero D, et al (2010) Early bone diagenesis in temperate environments. Part I: Surface features and histology. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 288:62–81. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2009.12.016>
- Fernández López S (2000) *Temas de Tafonomía*. Departamento de Paleontología, Universidad Complutense de Madrid
- France CAM, Sugiyama N, Aguayo E (2020) Establishing a preservation index for bone, dentin, and enamel bioapatite mineral using ATR-FTIR. *J Archaeol Sci Reports* 33:102551. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102551>

- García-Garduño, Margarita Victoria; Reyes-Gasgay J (2006) La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas* 9:90–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.045>
- Gómez A, Tornero C, Borrell Tena F, et al (2008) Un ejemplo de cavidad sepulcral del neolítico final en la costa nordeste peninsular: la Cueva de las Agulles (Corbera de Llobregat, Baix Llobregat). *IV Congr del Neolítico Penins* 27-30 noviembre 2006 92–97
- Hansen HB, Damgaard PB, Margaryan A, et al (2017) Comparing ancient DNA preservation in petrous bone and tooth cementum. *PLoS One* 12:1–18.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170940>
- Hendy J, Welker F, Demarchi B, et al (2018) A guide to ancient protein studies. *Nat Ecol Evol* 2:791–799.  
<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0510-x>
- Hollund H (2013) Diagenetic screening of bone samples; tools to aid taphonomic and archaeometric investigations. *Vrije Universiteit, Amsterdam*
- Jans MME (2005) *Histological Characterisation of Diagenetic Alteration of Archaeological Bone*. Vrije Universiteit Amsterdam
- Kendall C, Eriksen AMH, Kontopoulos I, et al (2018) Diagenesis of archaeological bone and tooth. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 491:21–37.  
<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.11.041>
- Kimura-Suda H, Ito T (2017) Bone quality characteristics obtained by Fourier transform infrared and Raman spectroscopic imaging. *J Oral Biosci* 59:142–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.job.2017.04.002>
- Kistler L, Ware R, Smith O, et al (2017) A new model for ancient DNA decay based on paleogenomic meta-analysis. *Nucleic Acids Res* 45:6310–6320.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx361>
- Kontopoulos I, Penkman K, McAllister GD, et al (2019) Petrous bone diagenesis: a multi-analytical approach. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 518:143–154.  
<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2019.01.005>
- Kontopoulos I, Penkman K, Mullin VE, et al (2020) Screening archaeological bone for palaeogenetic and palaeoproteomic studies. *PLoS One* 15:1–17.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235146>
- Kontopoulos I, Presslee S, Penkman K, Collins MJ (2018) Preparation of bone powder for FTIR-ATR analysis: The particle size effect. *Vib Spectrosc* 99:167–177.  
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.09.004>
- Latham KE, Miller JJ (2019) DNA recovery and analysis from skeletal material in modern forensic contexts. *Forensic Sci Res* 4:51–59.  
<https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1515594>
- Lebon M, Reiche I, Gallet X, et al (2016) Rapid quantification of bone collagen content by ATR-FTIR spectroscopy. *Radiocarbon* 58:131–145.  
<https://doi.org/10.1017/RDC.2015.11>
- Legeros RZ, Legeros JP (1984) Phosphate minerals in human tissues. *Phosphate Miner* 351–385.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-61736-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-61736-2_12)
- Leskovar T, Zupanič Pajnič I, Geršak ŽM, et al (2020) ATR-FTIR spectroscopy combined with data manipulation as a pre-screening method to assess DNA preservation in skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet* 44:102196.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102196>
- Lyman RL (1994) *Vertebrate Taphonomy*. Cambridge University Press
- 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. *J Solid State Chem* 255:27–35.  
<https://doi.org/10.1016/j.jssc.2017.07.025>
- Mrevlishvili GM, Svintradze D V. (2005) DNA as a matrix of collagen fibrils. *Int J Biol Macromol* 36:324–326.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.07.006>
- Mundorff AZ, Bartelink EJ, Mar-cash E (2009) DNA Preservation in Skeletal Elements from the World Trade Center Disaster: Recommendations for Mass Fatality. *J Forensic Sci* 54:739–745.  
<https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01045.x>
- Nielsen-Marsh CM, Hedges REM (2000) Patterns of diagenesis in bone I: The effects of site environments. *J Archaeol Sci* 27:1139–1150.  
<https://doi.org/10.1006/jasc.1999.0537>
- Oliva M (1976) Cueva del Roc de les Orenetes (Querolbs). *Prehistoria* 5:133–140
- Paredes Herrera M (2019) Técnicas actuales de extracción de ADN en Genética Forense. In: Crespillo Márquez MC, Barrio Caballero P (eds) *Genética Forense: Del laboratorio a los Tribunales*. Ediciones Díaz Santos, pp 107–131
- Pasteris JD, Wopenka B, Valsami-Jones E (2008) Bone and tooth mineralization: Why apatite? *Elements* 4:97–104.  
<https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.4.2.97>
- Pasteris JD, Yoder CH, Wopenka B (2014) Minerals in the human body: Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: The key

- to a better understanding of bone mineral. *Am Mineral* 99:16–27. <https://doi.org/10.2138/am.2014.4627>
- Pilloud MA, Megyesi MS, Truffer M, Congram D (2016) The taphonomy of human remains in a glacial environment. *Forensic Sci Int* 261:161.e1–161.e8. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.027>
- Pokines JT, Symes SA (2013) *Manual of Forensic Taphonomy*. CRC Press
- Ramirez-Pedraza I, Díez-Canseco C, Carbonell E, Tornero C (2020) Roc de les Orenetes: reobertura 47 anys després
- Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P (1998) Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 20:92–102. [https://doi.org/10.1016/S1350-4533\(98\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S1350-4533(98)00007-1)
- Ribéreau-Gayon A, Rando C, Morgan RM, Carter DO (2018) The suitability of visual taphonomic methods for digital photographs: An experimental approach with pig carcasses in a tropical climate. *Sci. Justice* 58:167–176
- Rohland N, Hofreiter M (2007a) Ancient dna extraction from bones and teeth. *Nat Protoc* 2:1756–1762. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>
- Rohland N, Hofreiter M (2007b) Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques* 42:343–352. <https://doi.org/10.2144/000112383>
- Smith CI, Nielsen-Marsh CM, Jans MME, Collins MJ (2007) Bone diagenesis in the European Holocene I: patterns and mechanisms. *J Archaeol Sci* 34:1485–1493. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2006.11.006>
- Snoeck C, Lee-Thorp JA, Schulting RJ (2014) From bone to ash: Compositional and structural changes in burned modern and archaeological bone. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 416:55–68. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2014.08.002>
- Sponheimer M, Lee-Thorp JA (1999) Alteration of enamel carbonate environments during fossilization. *J Archaeol Sci* 26:143–150. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0293>
- Surovell TA, Stiner MC (2001) Standardizing infra-red measures of bone mineral crystallinity: An experimental approach. *J Archaeol Sci* 28:633–642. <https://doi.org/10.1006/jasc.2000.0633>
- Thompson TJU, Gauthier M, Islam M (2009) The application of a new method of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of burned bone. *J Archaeol Sci* 36:910–914. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.11.013>
- Thompson TJU, Islam M, Bonniere M (2013) A new statistical approach for determining the crystallinity of heat-altered bone mineral from FTIR spectra. *J Archaeol Sci* 40:416–422. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.07.008>
- 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. *J Archaeol Sci* 31:721–739. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2003.11.003>
- Tütken T, Vennemann TW, Pfretzschner HU (2008) Early diagenesis of bone and tooth apatite in fluvial and marine settings: Constraints from combined oxygen isotope, nitrogen and REE analysis. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 266:254–268. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2008.03.037>
- Wadsworth C, Procopio N, Anderung C, et al (2017) Comparing ancient DNA survival and proteome content in 69 archaeological cattle tooth and bone samples from multiple European sites. *J Proteomics* 158:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.01.004>
- Watson JD, Crick FHC (1953) A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737–738
- Weiner S (2010) *Microarchaeology: Beyond the visible archaeological record*. Cambridge University Press
- Weiner S, Bar-Yosef O (1990) States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: A survey. *J Archaeol Sci* 17:187–196. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(90\)90058-D](https://doi.org/10.1016/0305-4403(90)90058-D)
- Weiner S, Traub W, Wagner HD (1999) Lamellar Bone: Structure–Function Relations. *J Struct Biol* 126:241–255. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4107>
- Wopenka B, Pasteris JD (2005) A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mater Sci Eng C* 25:131–143. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.008>
- Wright LE, Schwarcz HP (1996) Infrared and Isotopic Evidence for Diagenesis of Bone Apatite at Dos Pilas, Guatemala: Palaeodietary Implications. *J Archaeol Sci* 23:933–944. <https://doi.org/10.1006/jasc.1996.0087>

## 9. ANEXO I

Tabla con los resultados de los parámetros diagenéticos (mean±SD), la cuantificación de ADN (ng/mg) los porcentajes en peso estimado de nitrógeno (Nwt%) y colágeno (col. wt% estimado) para cada muestra. En verde, Cova de Agulles; en rojo, Roc de les Orenetes; En gris, individuo 1; en azul muestras actuales de los individuos 2,3 y 4. Para calcular el colágeno se utilizó el método de Lebon et al., 2016: Colágeno wt%= 113.13 amide I/ $\nu$ 3PO4+1.69; N wt%= 20.6 amida I/ $\nu$ 3PO4+0.31

| Muestra     | Am/P            | IRSF            | C/P             | BPI             | API             | C/C             | 900/1035        | FWHM             | AmI/C <sub>1</sub> | AmIII/P         | AmI/C <sub>2</sub> | ADN ng/mg extraído | Nwt% | Col. wt% estimado |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------|------|-------------------|
| CA04/11/30  | 0,086<br>±0,000 | 3,709<br>±0,011 | 0,250<br>±0,026 | 0,647<br>±0,075 | 0,329<br>±0,002 | 0,903<br>±0,111 | 0,114<br>±0,025 | 80,665<br>±0,263 | 0,492<br>±0,014    | 0,016<br>±0,003 | 1,094<br>±0,106    | 0,314              | 2,08 | 11,43             |
| CA04/8/1    | 0,101<br>±0,001 | 3,541<br>±0,008 | 0,290<br>±0,002 | 0,695<br>±0,054 | 0,369<br>±0,005 | 0,742<br>±0,072 | 0,134<br>±0,010 | 87,578<br>±0,067 | 0,529<br>±0,030    | 0,020<br>±0,001 | 1,152<br>±0,022    | 0,425              | 2,4  | 13,16             |
| CA04/12/11  | 0,099<br>±0,002 | 3,616<br>±0,044 | 0,277<br>±0,020 | 0,63<br>±0,023  | 0,363<br>±0,011 | 0,771<br>±0,008 | 0,13<br>±0,006  | 73,043<br>±0,051 | 0,554<br>±0,026    | 0,019<br>±0,001 | 1,175<br>±0,025    | 0,094              | 2,36 | 12,93             |
| CA04/12/61  | 0,096<br>±0,002 | 3,601<br>±0,013 | 0,298<br>±0,001 | 0,654<br>±0,001 | 0,344<br>±0,001 | 0,756<br>±0,082 | 0,152<br>±0,001 | 80,753<br>±0,059 | 0,5<br>±0,002      | 0,019<br>±0,000 | 0,98<br>±0,007     | 0,297              | 2,28 | 12,54             |
| CA04/3/41   | 0,088<br>±0,001 | 3,426<br>±0,024 | 0,273<br>±0,002 | 0,572<br>±0,010 | 0,334<br>±0,004 | 0,791<br>±0,010 | 0,125<br>±0,002 | 84,797<br>±0,015 | 0,511<br>±0,007    | 0,017<br>±0,001 | 1,115<br>±0,028    | 0,246              | 2,13 | 11,68             |
| CA04/12/58  | 0,092<br>±0,005 | 3,593<br>±0,052 | 0,281<br>±0,018 | 0,635<br>±0,028 | 0,305<br>±0,050 | 0,802<br>±0,018 | 0,139<br>±0,007 | 75,566<br>±0,428 | 0,497<br>±0,007    | 0,019<br>±0,002 | 1,001<br>±0,029    | 0,109              | 2,2  | 12,04             |
| CA04/11/32  | 0,095<br>±0,001 | 3,681<br>±0,003 | 0,227<br>±0,004 | 0,585<br>±0,046 | 0,397<br>±0,034 | 0,816<br>±0,019 | 0,118<br>±0,002 | 83,987<br>±0,346 | 0,645<br>±0,009    | 0,016<br>±0,000 | 1,239<br>±0,010    | 0,203              | 2,26 | 12,42             |
| CA04/4/96   | 0,103<br>±0,003 | 3,535<br>±0,049 | 0,307<br>±0,011 | 0,66<br>±0,004  | 0,395<br>±0,006 | 0,797<br>±0,003 | 0,15<br>±0,004  | 80,085<br>±0,074 | 0,546<br>±0,009    | 0,020<br>±0,002 | 1,115<br>±0,025    | 0,154              | 2,44 | 13,36             |
| CA04/8/16   | 0,111<br>±0,001 | 3,378<br>±0,036 | 0,363<br>±0,015 | 0,73<br>±0,037  | 0,419<br>±0,003 | 0,794<br>±0,047 | 0,169<br>±0,003 | 88,495<br>±0,022 | 0,492<br>±0,017    | 0,022<br>±0,001 | 1,055<br>±0,026    | 0,384              | 2,59 | 14,19             |
| CA04/4/33   | 0,101<br>±0,003 | 3,67<br>±0,076  | 0,250<br>±0,012 | 0,515<br>±0,061 | 0,369<br>±0,047 | 0,772<br>±0,029 | 0,127<br>±0,013 | 88,212<br>±0,13  | 0,627<br>±0,036    | 0,025<br>±0,001 | 1,237<br>±0,129    | 0,356              | 2,38 | 13,06             |
| RO19/2/1073 | 0,033<br>±0,001 | 5,224<br>±0,007 | 0,139<br>±0,000 | 0,36<br>±0,005  | 0,16<br>±0,009  | 0,851<br>±0,007 | 0,084<br>±0,001 | 73,189<br>±0,726 | 0,299<br>±0,005    | 0,003<br>±0,000 | 0,494<br>±0,005    | 0,024              | 1    | 5,46              |
| RO19/2/1022 | 0,135<br>±0,013 | 3,981<br>±0,151 | 0,343<br>±0,040 | 1,002<br>±0,328 | 0,617<br>±0,199 | 1,072<br>±0,278 | 0,174<br>±0,016 | 81,288<br>±0,141 | 0,623<br>±0,002    | 0,032<br>±0,002 | 1,225<br>±0,025    | 0,036              | 3,09 | 16,94             |
| RO19/4/1409 | 0,112<br>±0,003 | 3,592<br>±0,069 | 0,243<br>±0,006 | 0,569<br>±0,014 | 0,389<br>±0,016 | 0,777<br>±0,035 | 0,12<br>±0,002  | 87,587<br>±0,162 | 0,699<br>±0,006    | 0,021<br>±0,001 | 1,414<br>±0,021    | 0,000              | 2,61 | 14,34             |
| RO19/2/1068 | 0,105<br>±0,009 | 3,722<br>±0,042 | 0,205<br>±0,022 | 0,482<br>±0,072 | 0,36<br>±0,055  | 0,775<br>±0,011 | 0,105<br>±0,010 | 75,339<br>±0,425 | 0,755<br>±0,000    | 0,020<br>±0,002 | 1,474<br>±0,025    | 0,123              | 2,47 | 13,53             |
| RO19/4/1385 | 0,108<br>±0,000 | 3,697<br>±0,002 | 0,249<br>±0,000 | 0,543<br>±0,000 | 0,372<br>±0,000 | 0,749<br>±0,001 | 0,127<br>±0,000 | 91,248<br>±0,215 | 0,683<br>±0,000    | 0,024<br>±0,000 | 1,341<br>±0,000    | 0,406              | 2,54 | 13,92             |
| RO19/2/1064 | 0,103<br>±0,000 | 3,669<br>±0,004 | 0,223<br>±0,001 | 0,503<br>±0,000 | 0,37<br>±0,000  | 0,753<br>±0,003 | 0,117<br>±0,000 | 90,42<br>±0,017  | 0,715<br>±0,000    | 0,021<br>±0,000 | 1,365<br>±0,000    | 0,448              | 2,42 | 13,29             |
| RO19/2/1117 | 0,086<br>±0,000 | 3,62<br>±0,002  | 0,168<br>±0,002 | 0,384<br>±0,000 | 0,31<br>±0,000  | 0,806<br>±0,008 | 0,089<br>±0,001 | 77,855<br>±0,048 | 0,764<br>±0,008    | 0,014<br>±0,000 | 1,443<br>±0,015    | 0,099              | 2,08 | 11,43             |

|                    |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                   |                 |                 |                 |       |      |       |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|------|-------|
| <b>RO19/5/1370</b> | 0,097<br>±0,001 | 3,775<br>±0,011 | 0,182<br>±0,001 | 0,436<br>±0,028 | 0,331<br>±0,020 | 0,786<br>±0,005 | 0,112<br>±0,027 | 93,716<br>±0,065  | 0,801<br>±0,006 | 0,014<br>±0,000 | 1,352<br>±0,290 | 0,977 | 2,3  | 12,63 |
| <b>RO19/2/1065</b> | 0,099<br>±0,000 | 3,586<br>±0,036 | 0,180<br>±0,000 | 0,413<br>±0,000 | 0,329<br>±0,025 | 0,786<br>±0,028 | 0,093<br>±0,001 | 91,185<br>±0,161  | 0,861<br>±0,001 | 0,013<br>±0,001 | 1,667<br>±0,021 | 0,453 | 2,35 | 12,9  |
| <b>RO19/2/1106</b> | 0,048<br>±0,000 | 4,707<br>±0,005 | 0,127<br>±0,005 | 0,291<br>±0,010 | 0,158<br>±0,000 | 0,836<br>±0,029 | 0,075<br>±0,001 | 82,019<br>±0,027  | 0,505<br>±0,018 | 0,005<br>±0,000 | 0,851<br>±0,007 | 0,237 | 1,3  | 7,14  |
| <b>Ind.1/SXX/1</b> | 0,083<br>±0,000 | 4,426<br>±0,171 | 0,136<br>±0,000 | 0,259<br>±0,001 | 0,247<br>±0,001 | 0,965<br>±0,003 | 0,08<br>±0,000  | 91,632<br>±0,282  | 0,956<br>±0,005 | 0,010<br>±0,001 | 1,617<br>±0,002 | 0,635 | 2,03 | 11,13 |
| <b>Ind.1/SXX/2</b> | 0,069<br>±0,015 | 4,59<br>±0,155  | 0,118<br>±0,027 | 0,247<br>±0,044 | 0,219<br>±0,052 | 0,898<br>±0,083 | 0,072<br>±0,011 | 93,226<br>±0,958  | 0,869<br>±0,033 | 0,008<br>±0,002 | 1,405<br>±0,158 | 0,274 | 1,73 | 9,51  |
| <b>Ind.1/SXX/3</b> | 0,069<br>±0,000 | 4,512<br>±0,004 | 0,122<br>±0,000 | 0,258<br>±0,000 | 0,226<br>±0,000 | 0,944<br>±0,000 | 0,072<br>±0,000 | 75,352<br>±0,014  | 0,849<br>±0,000 | 0,008<br>±0,000 | 1,429<br>±0,000 | 0,166 | 1,73 | 9,47  |
| <b>Ind.1/SXX/4</b> | 0,088<br>±0,000 | 4,36<br>±0,045  | 0,149<br>±0,001 | 0,553<br>±0,022 | 0,525<br>±0,015 | 0,9<br>±0,016   | 0,081<br>±0,001 | 92,339<br>±0,053  | 0,906<br>±0,016 | 0,012<br>±0,000 | 1,672<br>±0,000 | 0,948 | 2,12 | 11,61 |
| <b>Ind.2</b>       | 0,129<br>±0,013 | 3,321<br>±0,035 | 0,222<br>±0,030 | 0,471<br>±0,043 | 0,438<br>±0,058 | 0,844<br>±0,014 | 0,113<br>±0,012 | 110,038<br>±0,065 | 0,928<br>±0,017 | 0,025<br>±0,004 | 1,821<br>±0,090 | 7,266 | 2,97 | 16,29 |
| <b>Ind.3</b>       | 0,14<br>±0,007  | 3,333<br>±0,038 | 0,189<br>±0,001 | 0,43<br>±0,004  | 0,401<br>±0,048 | 0,76<br>±0,038  | 0,11<br>±0,010  | 96,428<br>±0,033  | 0,958<br>±0,017 | 0,027<br>±0,006 | 1,656<br>±0,162 | 0,199 | 3,19 | 17,49 |
| <b>Ind.4</b>       | 0,137<br>±0,001 | 3,327<br>±0,041 | 0,205<br>±0,030 | 0,488<br>±0,036 | 0,472<br>±0,047 | 0,831<br>±0,003 | 0,1<br>±0,007   | 96,457<br>±0,086  | 0,95<br>±0,015  | 0,023<br>±0,003 | 1,943<br>±0,116 | 0,873 | 3,12 | 17,14 |

