



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Investigación de alteraciones inducidas por la temperatura en restos óseos mediante espectroscopía raman

Alumno: Belén Hernández Robles

Julio, 2014

ÍNDICE.

ABSTRACT.	3
1. INTRODUCCIÓN.	5
1.1. Estudios previos sobre huesos.	7
1.2. Espectroscopía Raman.	9
1.2.1. Intensidad de las bandas Raman.	10
1.2.2. Instrumentación.	10
1.2.3. Ruidos e interferencias en espectroscopía Raman.	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	16
3.1. Instrumentación.	16
3.1.1. Condiciones de medida.	19
3.2. Muestras.	20
3.3. Tratamientos.	22
3.3.1. En agua dulce.	22
3.3.2. En agua salada.	23
3.3.3. Limpieza previa.	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	24
4.1. Estudios preliminares.	25
4.2. Medidas con espectrómetro FT-Raman y láser de 1064 nm.	27
4.3. Tratamiento para la eliminación de la fluorescencia.	30
5. CONCLUSIONES.	33
6. BIBLIOGRAFÍA.	33

Resumen:

El cambio en la estructura y composición de restos óseos humanos debido a los cambios de temperatura en los mismos es de gran importancia en ámbito arqueológico y también forense. Esto es así porque los huesos son la parte del individuo que más perdura al paso del tiempo y la que permanece casi intacta en casos de incendios u homicidios.

Se han realizado estudios previos en los que no han llegado a apreciarse esos cambios estructurales y de composición de forma significativa, sino únicamente cambios morfológicos. Debido a esto, ha sido propuesto el estudio mediante espectroscopía Raman, ya que ésta presenta ventajas frente a las técnicas ya utilizadas, como son difracción de rayos X, espectroscopia por dispersión de energía de rayos X, adsorción de nitrógeno y microscopía de escáner electrónica. La mayor ventaja que presenta esta técnica es que la muestra a medir no necesita ningún tipo de tratamiento previo antes de medirla.

En este estudio se pretende optimizar las condiciones experimentales en las que puede ser tratados restos óseos para su posterior estudio y evaluar la utilidad de la espectroscopía Raman para conocer los cambios estructurales y morfológicos producidos en huesos humanos hervidos en aguas de distinta composición durante distintos periodos de tiempo. Para ello, las muestras de huesos humanos fueron sometidas a tratamientos de ebullición, tanto en agua dulce como salada, a distintas temperaturas. Seguidamente fueron medidas en tres espectrómetros distintos, dos de ellos eran microespectrómetros dispersivos y otro un espectrómetro con transformada de Fourier. Viendo que los espectros presentaban fondo de fluorescencia, se intentaron corregir matemáticamente y esto produjo ruido en ellos. Para eliminar esa fluorescencia, se llevó a cabo otro tratamiento con peróxido de hidrógeno y acetona. Aunque los espectros finalmente obtenidos mostraban más cambios a distintas temperaturas que aquellos sin que se les aplicara el tratamiento, deberían realizarse más medidas e incluso mapeos, para poder observar claramente esos cambios y poderlos demostrar con las técnicas empleadas, ya que se está trabajando con muestras cuyo principal problema, aparte de la fluorescencia, es la heterogeneidad que presentan.

Abstract:

The change in the structure and composition of human bones, due to temperature changes in them, is very important in archaeological and forensic context. This is because bones are the most endurance part of the individual that support the test of time and remains almost intact in case of fire or murder.

Previous studies have been conducted in which there have come to appreciate these structural and composition changes significantly, but only morphological changes. Due to this, it has been proposed to study by Raman spectroscopy, since it has advantages over the techniques already used, such as X-ray diffraction, energy dispersive x-ray spectroscopy, nitrogen adsorption and scanning electron microscopy. The principal advantage of this technique is that the sample to be measured requires no pretreatment before measuring.

This study aims to optimize the experimental conditions that skeletal remains can be treated for further study and evaluate the usefulness of Raman spectroscopy for structural and morphological changes in boiled human bones in different composition of water during different periods of time. To do this, samples of human bones were subjected to boiling treatments in both fresh and salt water, at different temperatures. After that, they were measured in three different spectrometers; two of them were dispersive microspectrometers spectrometers and a Fourier transformed one. Since the spectra showed strong background fluorescence, they were initially treated mathematically and due to that, noise was produced. To eliminate this fluorescence a further treatment is conducted with hydrogen peroxide and acetone. Although the spectra finally obtained showed more changes at different temperatures than those without apply that treatment, more measurements and even mapping should be done in order to clarify these changes, because when working with this kind of samples the main problem, apart from fluorescence, is the heterogeneity.

1. INTRODUCCIÓN.

El estudio de restos óseos es de gran ayuda tanto en el ámbito forense como en el campo de la arqueología, ya que el hueso es la parte del esqueleto humano que más perdura en el hombre tras el paso del tiempo; los huesos son también los únicos restos humanos que permanecen casi intactos en, por ejemplo, incendios, accidentes de tráfico u homicidios.

El tejido óseo (Ross-Pawlina, 2013) es un tejido conjuntivo que se caracteriza por tener una matriz extracelular mineralizada. Este tejido, el óseo, es una forma de tejido conjuntivo compuesto por células y matriz extracelular. La diferencia que existe entre el tejido óseo de los otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz. Esta produce un tejido muy duro que sirve de sostén y protección. El mineral es fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$

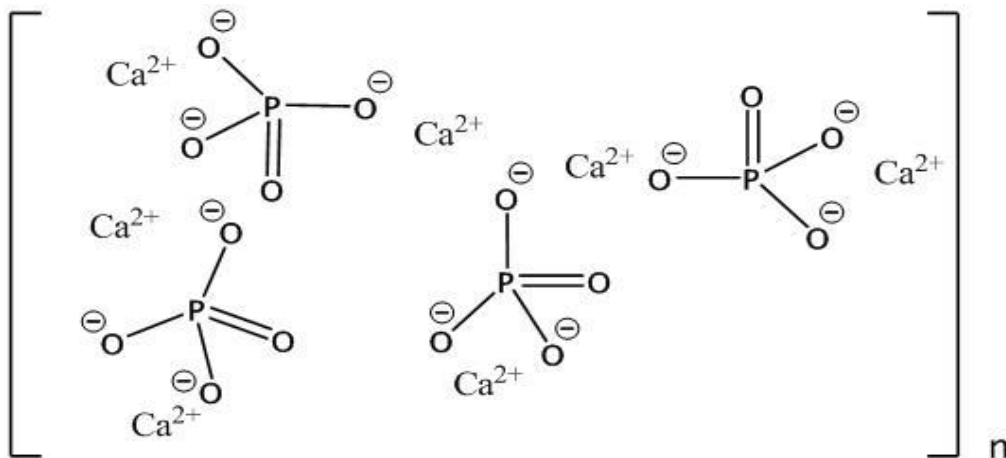


Ilustración 1: Estructura de la hidroxiapatita.

La matriz del hueso contiene sobre todo colágeno junto con otras proteínas de la matriz. Todas las moléculas de colágeno constituyen alrededor del 90% del peso total de las proteínas de la matriz ósea.

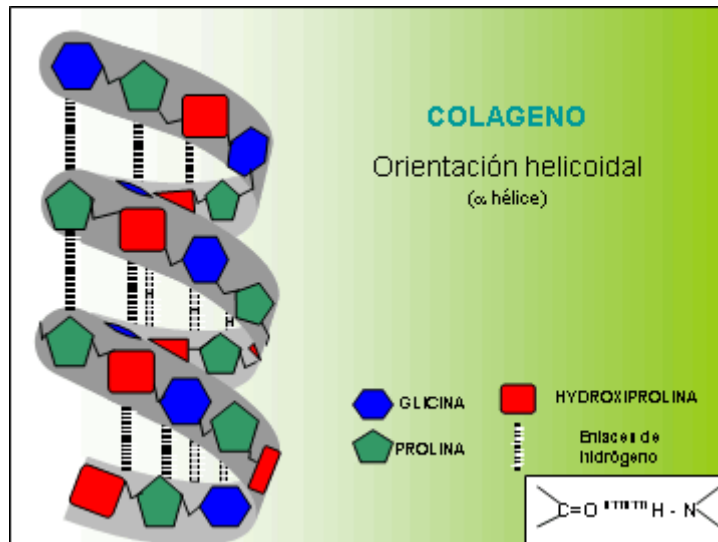


Ilustración 2: Estructura de la molécula de colágeno.

Un hueso está compuesto por tejido óseo y otros tejidos conjuntivos, junto con los vasos sanguíneos y nervios. El tejido óseo se clasifica en compacto (denso) y esponjoso (trabeculado). Cuando se examina la superficie de corte de un hueso se puede apreciar que una capa densa, compacta, forma la superficie ósea externa (tejido óseo compacto), mientras que una malla de aspecto esponjoso compuesta por trabéculas (delgadas espículas de tejido óseo) forma la parte interna del hueso (tejido óseo esponjoso).

Los huesos se clasifican según su forma; la ubicación de los tejidos óseos compacto y esponjoso varía de acuerdo con la forma del hueso.

Los tejidos óseos esponjosos se ubican en partes específicas de los huesos.

Según su forma, los huesos se pueden clasificar en cuatro grupos:

- Huesos largos: tienen una longitud mayor que las otras dos dimensiones.
- Huesos cortos: tienen sus tres dimensiones casi iguales.
- Huesos planos: son delgados y anchos, formados por dos capas relativamente gruesas de tejido óseo compacto con una capa interpuesta de tejido óseo esponjoso.
- Huesos irregulares: poseen una forma que no permite clasificarlos dentro de ninguno de los tres grupos anteriores. La forma puede ser compleja.

Los huesos largos tienen un cuerpo llamado diáfisis y dos extremos que reciben el nombre de epífisis.

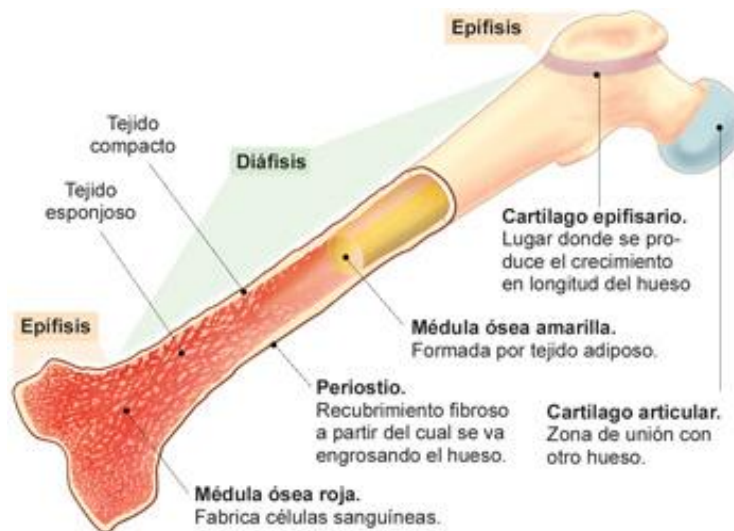


Ilustración 3: Partes de un hueso largo (Ross-Pawlina, 2013).

En arqueología, el estudio de los huesos nos sirve de ayuda para conocer algunos rituales que pudieran hacerse a los humanos en distintas culturas antes de enterrarlos en la antigüedad. También nos pueden proporcionar información sobre las costumbres que el hombre de la época pudiera tener, dependiendo del estado o, sobre todo, de la información que pueda proporcionar el estudio de esos restos óseos, los cuales son los únicos restos de esos humanos que quedan en la actualidad.

Respecto al ámbito forense, nos ayuda a encontrar la información necesaria para determinar en qué estado se encontró el cuerpo una vez fallecido el individuo, ya que, como se ha dicho anteriormente, es uno de los pocos restos que quedan del humano, sobre todo si este sufrió quemaduras de fuego o expuesto a cualquier otra muerte violenta.

1.1. Estudios previos sobre huesos.

Antes de comenzar explicando los distintos estudios que fueron realizados y compararlos al aquí redactado, ha de decirse que éste se centra en conocer qué tipo de instrumentación es la más adecuada para la medición de estas muestras y qué información se obtiene dependiendo del tratamiento aplicado a las mismas, así como la alteración de la composición y estructura de éstas.

Estudios sobre huesos hervidos en aguas dulces o saladas (Trujillo-Mederos et al., 2012) y sobre las diferencias entre huesos hervidos en el Neolítico comparados con el contemporáneo (Bosch et al., 2011) mediante difracción de rayos X, espectroscopia por dispersión de energía de rayos X, adsorción de nitrógeno y microscopía de escáner electrónica no han sido lo suficientemente precisos como para averiguar las diferencias estructurales entre diferentes muestras de huesos. Tan sólo consiguieron diferenciarlas teniendo en cuenta su morfología, es decir, el aspecto que presentaban.

Esos estudios fueron realizados para obtener información, sobre todo, relacionada con el ámbito arqueológico. Se estudió la alteración de la estructura y composición de los huesos por el interés cultural que esto conlleva, a la vez que su morfología (Malgosa et al., 2008; White and Hannus, 1983).

Su estudio ha llevado a dar a conocer ciertos rituales que eran empleados a la hora de enterrar cuerpos humanos en la época del Neolítico (Jiménez Brobeil, 1990). Unos de esos rituales eran, por ejemplo, el canibalismo o la incineración de los cuerpos. Se llevó a cabo el estudio de antiguos habitantes de una cueva en la ciudad de Granada (Cáceres et al., 2007; Robert et al., 2002) en donde se distinguió un hueso hervido de uno sin hervir (Trujillo-Mederos et al., 2012). Se encontró que ciertos criterios macroscópicos para distinguir huesos hervidos a sin hervir coincidían con los resultados microscópicos. Esto les llevó a la conclusión de que la única diferencia era morfológica. Comparando los resultados de estas muestras con las muestras tomadas del Neolítico, se pudo decir finalmente que el cambio sufrido en su morfología era causado por el ataque de hongos.

Se llevó a cabo otro estudio (Bosch et al., 2011), mediante las técnicas anteriormente dichas, en el cual pudo deducirse que la caracterización de los huesos hervidos es crucial para la antropología, ya no sólo para comprender los hábitos humanos, sino porque la ebullición había sido propuesta como un análogo al cambio en el aspecto de los huesos (Hurlbut, 2000). Uno de esos hábitos humanos se llegó a pensar que era el descarnamiento. Para el mejor conocimiento de estos hábitos se llevó a cabo el estudio en agua marina, ya que hubo otros estudios en los que se empleó agua dulce (Bosch et al., 2011).

En este estudio se obtuvo información por separado de los efectos del cloruro de sodio en la hidroxiapatita y en colágeno, que son los componentes mayoritarios del hueso. Se realizó el estudio mediante difracción de rayos X, cuyos resultados

fueron que, a parte de la hidroxiapatita, aparecen cristales de halita en casos posteriores.

En este trabajo se propone el estudio de la alteración de la composición y estructura de restos óseos sometidos a cambios de temperatura mediante espectroscopía Raman.

Se propuso el empleo de esta técnica ya que tiene una ventaja notable en comparación a las demás técnicas, y es que la muestra no necesita un tratamiento previo antes de ser medida. Además de esto, la espectroscopía Raman es acertada para la medición de este tipo de muestras ya que los huesos están compuestos de materia orgánica (colágeno y otras proteínas, de tipo albuminoide); los espectros Raman son semejantes a los de infrarrojo, en cuanto a que presentan regiones útiles para la detección de grupos funcionales y regiones de “huella digital” que permiten la identificación de compuestos específicos; sin embargo, los espectros Raman proporcionan más información acerca de ciertos tipos de compuestos orgánicos que los correspondientes espectros infrarrojos, por ejemplo, los derivados cicloparafínicos tienen un pico Raman característico a unos $700-1200\text{ cm}^{-1}$; el pico infrarrojo asociado con esta vibración es débil y no existe (A.Skoog et al.,1994).

1.2. Espectroscopía Raman.

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución. Esta técnica es capaz de proporcionar en un corto periodo de tiempo (minutos o incluso segundos) información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis mediante esta técnica se basa en el examen de la luz dispersada por un material cuando sobre este incide sobre un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz se dispersa de forma inelástica y se producen pequeños cambios de frecuencia de la luz incidente. Como se explicó en el apartado “1.1. Estudios previos realizados” la espectroscopía Raman es una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesitar éste ningún tipo de preparación especial y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no destructiva; además se pueden analizar materiales en cualquier estado: sólido, líquido o gaseoso.

Para obtener los espectros Raman hay que irradiar una muestra con una fuente de radiación láser potente que es monocromática visible o infrarroja. Durante esa irradiación y mediante un espectrómetro adecuado, se registra el espectro de la radiación dispersada a un ángulo de, normalmente, 90 grados. Las intensidades de las líneas Raman suelen ser el 0,001% de la intensidad de la fuente, por lo que medirlas y detectarlas es muy complicado. Sin embargo, las líneas de resonancia Raman son considerablemente más intensas.

1.2.1. Intensidad de las bandas Raman.

La potencia o intensidad de un pico Raman normal depende de la polarizabilidad de la molécula, de la intensidad de la fuente y de la concentración de grupos activos.

Las intensidades Raman, por lo general, son directamente proporcionales a la concentración de las especies activas. Desde este punto de vista, la espectroscopía Raman se parece más a la fluorescencia que a la absorción, en la cual existe una relación logarítmica entre la intensidad y la concentración.

1.2.2. Instrumentación.

Los instrumentos para la espectroscopía Raman moderna constan de tres componentes: una fuente láser, un sistema de iluminación de la muestra y un espectrómetro adecuado.

- Fuentes:

Las fuentes que se utilizan habitualmente son láseres, ya que éstos poseen alta intensidad, la cual es necesaria para producir dispersión Raman lo suficientemente intensa como para poderse medir con una relación señal/ruido razonable.

Como la intensidad de la dispersión Raman varía con la cuarta potencia de la frecuencia, las fuentes de ion argón y criptón, que emiten en región azul y verde del espectro, presentan esta ventaja sobre las otras fuentes mostradas en la tabla. Por ejemplo, la línea del argón a 488 nm proporciona líneas Raman casi tres veces más intensas que las excitadas mediante la fuente helio/neón, para la misma potencia de entrada.

Los láseres de diodo de 785 nm y los Nd/YAG de 1064 nm, que emiten radiación del infrarrojo cercano, se usan cada vez más como fuentes de excitación. Las fuentes del infrarrojo cercano presentan dos ventajas importantes sobre los láseres de longitud de onda más corta. La primera ventaja es que pueden funcionar a potencias muy superiores (hasta 50 W), sin producir fotodescomposición de la muestra. La segunda es que no son tan energéticas como para poblar un número significativo de estados electrónicos excitados capaces de producir fluorescencia. De este modo, con estos láseres la fluorescencia es menos intensa o casi inexistente. La línea a 1064 nm de Nd/YAG es particularmente efectiva para eliminar esa fluorescencia. Las dos líneas del láser de diodos en serie a 785 nm también reducen notablemente la fluorescencia en la mayoría de los casos.

- Sistemas de iluminación de la muestra:

La manipulación en espectroscopía Raman es más sencilla que en espectroscopía en el infrarrojo, ya que puede emplearse el vidrio para las ventanas, lentes y otros componentes ópticos, en lugar de los haluros cristalinos que resultan más frágiles y menos estables a los componentes atmosféricos. Además, la fuente láser se puede enfocar con facilidad sobre una zona pequeña de la muestra y, a la vez, la radiación emitida se puede enfocar sobre una rendija. Como consecuencia, se pueden examinar muestras muy pequeñas. De hecho, un recipiente que se utiliza normalmente para muestras líquidas no absorbentes, es un capilar como el que se emplea para medir el punto de fusión.

- Espectrómetros Raman: Tipos y diferencias entre ellos.

En la actualidad, la mayoría de los espectrómetros Raman que se comercializan son los instrumentos FT-Raman con detectores de germanio enfriados o instrumentos multicanal con dispositivos de acoplamiento de carga (CCD). Estos detectores, a diferencia de los tubos fotomultiplicadores que se empleaban sobre los años ochenta, son sensibles a la radiación de 785 nm producida por los láseres de diodo, los cuales provocan la excitación Raman de muchos compuestos sin generar una fluorescencia apreciable. Sin embargo, los dispositivos de acoplamiento de carga no son sensibles a la radiación de 1064 nm procedente del láser Nd/YAG.

La siguiente figura muestra el esquema de transformada de Fourier para las medidas Raman.

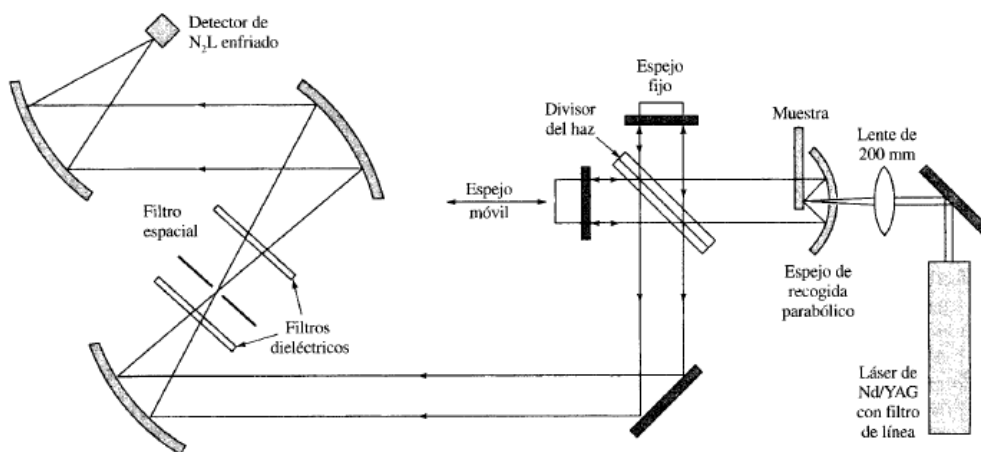


Ilustración 4: Esquema de la óptica de un espectrómetro FT-Raman (A.Skoog et al.,1994).

El interferómetro es del mismo tipo que el usado en los instrumentos de infrarrojo. El detector es un fotoconductor de germanio enfriado con nitrógeno líquido. Dado que la intensidad de la línea Rayleigh es varios órdenes de magnitud mayor que la línea Raman, en estos instrumentos se suelen emplear filtros de interferencia holográficos llamados “filtros de corte” o un monocromador para limitar la radiación que llega al detector de longitudes de onda superiores a las generadas por la fuente. Con esta disposición, sólo se detecta la parte Stokes del espectro. Algunos instrumentos de transformada de Fourier utilizan filtros diseñados para eliminar sólo la longitud de onda de la fuente láser. Independientemente del sistema de filtro que emplee para ello, la pendiente del perfil de transmitancia del filtro limita las menores frecuencias que puedan observarse.

La figura mostrada a continuación muestra un esquema de un espectrómetro de dispersión Raman característico con un detector de acoplamiento de carga.

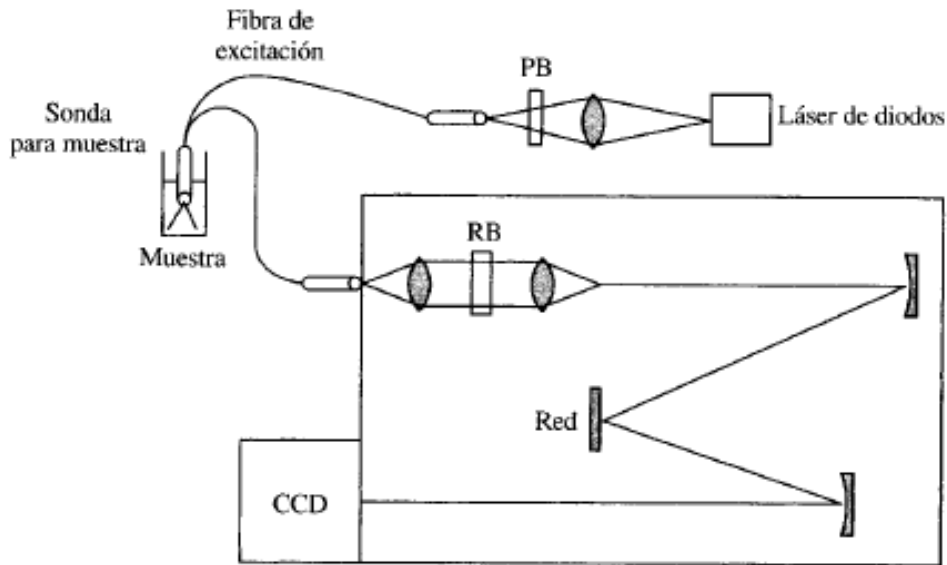


Ilustración 5: Espectrómetro Raman dispersivo multicanal con un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD), PB es un filtro de interferencia de paso de banda; RB es un filtro de rechazo de la banda Rayleigh. (A.Skoog et al., 1994).

La fuente es un láser de diodos y el sistema de filtros selecciona la radiación de 783nm. El haz se enfoca sobre el extremo de la fibra de excitación por medio de una lente y se transmite la sonda de fibra que consta de una fibra de excitación rodeada de 19 fibras de recogida. Las últimas transportan la emisión Raman a la rendija del monocromador donde atraviesa un filtro que elimina la radiación de dispersión Rayleigh. Una red de difracción que contiene 600 surcos/mm dispersa la radiación y la refleja sobre el dispositivo de acoplamiento de carga fabricado con 258 por 1152 pixels. Esos 258 pixels se suman antes de cada lectura.

1.2.3. Ruidos e interferencias en espectroscopía Raman.

Uno de los problemas inherentes a la adquisición de cualquier señal es el ruido presente en la medida. En el caso de la obtención de espectros Raman, los ruidos más habituales pueden ser clasificados en cinco grupos diferentes:

- Ruido shot: es el resultado de la naturaleza aleatoria de la luz. Es una fuente de ruido inevitable en la medida de espectros Raman.
- Ruido generado por la muestra: incluye emisiones ópticas no deseadas y generadas por la propia muestra como es el caso de la fluorescencia. Esta

se produce al incidir un fotón sobre una molécula, el cual es absorbido y la molécula pasa a un estado electrónico excitado donde pertenece unas decenas de nanosegundos, para saltar a otro estado excitado pero de menor energía, liberando un fotón de frecuencia más baja que el incidente. En los espectros Raman la fluorescencia suele presentarse como una suave curvatura de la línea de base y puede alcanzar una intensidad que llegue a enmascarar por completo la intensidad de las bandas Raman. El ruido generado por la muestra incluye también los cambios de intensidad Raman debidos a cambios en la muestra no relacionados con la concentración; por ejemplo, tanto la intensidad de las bandas como la posición pueden variar en función de la temperatura de la muestra, aunque son cambios que tienden a ser pequeños. La heterogeneidad de la muestra también puede crear ruido ya que el análisis realizado en un punto de la muestra no tiene por qué ser representativo de la muestra completa.

- Ruido generado por la instrumentación: depende del diseño específico de la instrumentación que se emplea en el análisis. Incluye tanto el ruido térmico como el de lectura.
- Ruido computacional: se refiere al introducido en el proceso de digitalización de la señal de salida del detector.
- Ruido generado por fuentes externas: este ruido se genera externamente al equipo Raman o la muestra que se está analizando. Suele estar causado por alguna fuente de luz externa que contamina la señal en algún punto del equipo de medida aunque, si el equipo y el contenedor de la muestra a medir están cuidadosamente diseñados, deberían de ser inmunes a las radiaciones externas. Suelen ser frecuentes fuentes externas de ruido la luz de los fluorescentes y la luz solar. Una fuente de ruido externo no óptico es la generada por las partículas de alta energía como los rayos cósmicos que llegan al detector del equipo de medida. Estos emiten electrones los cuales son indistinguibles de los fotoelectrones. El resultado es un pico muy estrecho y de gran intensidad en el espectro de dispersión Raman. Los cósmicos aparecen de forma y posición aleatorias.

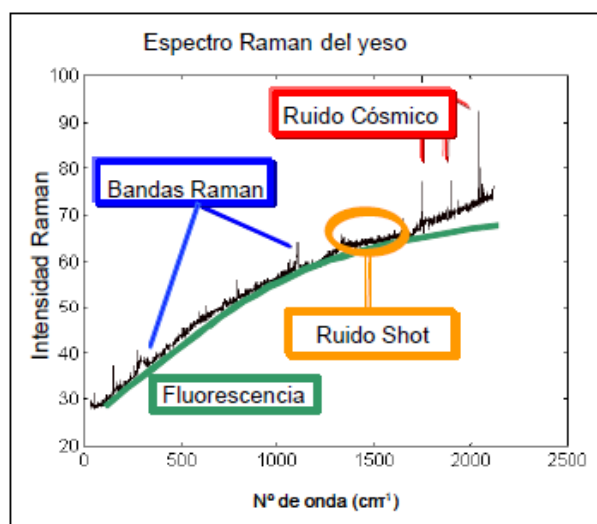


Ilustración 6: Ejemplo esquemático de la procedencia de ruido en un espectro.

De todos estos posibles ruidos que se pueden encontrar, los más habituales son el ruido shot, el cósmico y aquel ruido generado por el fondo de fluorescencia. La fluorescencia es una de las interferencias más importantes que pueden afectar a la medida de los espectros Raman.

La fluorescencia es un fenómeno de ciertas sustancias mediante la cual estas tienen la capacidad de absorber luz a una determinada longitud de onda, generalmente en el rango del ultravioleta, y luego emiten luz en una longitud más larga; dicho de otro modo, son sustancias que absorben fotones con una determinada energía, y liberan fotones con menor energía. En este proceso la luz es recibida y vuelta a emitirse en millonésimas de segundo, por lo que cuando este “estímulo” cesa, también lo hace el fenómeno de la fluorescencia. A diferencia del efecto Raman, la fluorescencia es un fenómeno muy sensible, lo que provoca una elevada señal de fondo y que puede hacer imperceptibles las señales Raman y cuya corrección puede provocar efectos de ruido.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

La hipótesis de partida de este trabajo se basa en la posibilidad de obtener información sobre los cambios estructurales sufridos por los restos óseos debido

a distintos tratamientos de cocción utilizando espectroscopía Raman. Se propone esta técnica porque permite obtener información estructural sobre materiales orgánicos e inorgánicos de forma sencilla.

Los objetivos en esta investigación son:

- optimizar las condiciones experimentales en las que puede ser tratadas restos óseos para su posterior estudio.
- evaluar la utilidad de la espectroscopía Raman para conocer los cambios estructurales y morfológicos producidos en huesos humanos hervidos en aguas de distinta composición durante distintos periodos de tiempo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Instrumentación.

Para la realización de las medidas se emplearon tres espectrómetros Raman

- Espectrómetro innoRam (B&W TEK) portátil provisto de una línea de láser de excitación 785 nm (300mW) y una parte posterior delgada con un detector CCD bidimensional termoeléctrico que enfría a -20°C . La gama espectral del espectrómetro es $65\text{-}2565\text{ cm}^{-1}$. Este aparato pesa alrededor de 10 kg. El espectrómetro y el láser están conectados a un cabezal de sonda con cables de fibra óptica (fibra de excitación de $100\text{ }\mu\text{m}$; colección de fibra- $200\mu\text{m}$). La sonda Raman fue acoplada a un microscopio de vídeo con una cámara integrada y un iluminador LED para permitir el muestreo in situ de precisión empleando un objetivo 20x distancia utilizada proporcionando un tamaño de punto láser sobre 85 nm de diámetro.



Ilustración 7: Microespectrómetro Raman dispersivo (Foto de Ignacio Olea Albar)

- Microscopio Raman confocal inVia de Renishaw. El equipo posee dos fuentes de excitación: Láser de diodo de 785 nm, refrigerado por aire, (potencia de salida 300 Mw) y Láser de ion Ar de 514 nm de Láser-Physics, refrigerado por aire, (potencia de salida 20mW). Potencia láser variable mediante filtros de intensidad neutra. Lleva incorporados un conjunto de filtros dieléctricos de tipo “edge” con transmisión a partir de 100 cm^{-1} . Incorpora dos redes de difracción de alta resolución: 1200 L/mm para láser 785 nm y 1800 L/mm para láser de 514 nm y dos juegos de lentes intercambiables. Detector cámara CCD ampliada para NIR y UV, refrigerada por sistema Peltier ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$). Microscopio confocal LEIKA DM LM.



Ilustración 8: Microespectrómetro Raman confocal dispersivo (Catálogo de servicios y tarifas de Centro de Instrumentación Científico-Técnico de la Universidad de Jaén)

- Espectrómetro FT-Raman de la marca Bruker con una fuente de excitación láser Nd:Yag de 1064 nm (potencia 1000 mW). El espectrómetro está equipado con otras fuentes estándar como la fuente de luz blanca para la corrección del background y una fuente interna para alineamiento. El cambio entre ellas se realiza desde el software. El detector es de diodo de Germanio refrigerado con Nitrógeno líquido (con autonomía de 5 días). Dispone de un sistema de excitación a 90o, además del estándar a 180o. Como características reseñables pueden destacarse: resolución mejor que 0.5 cm⁻¹ o precisión en n^o de onda mejor que 0.1 cm⁻¹.



Ilustración 9: Espectrómetro FT-Raman (Catálogo de servicios y tarifas de Centro de Instrumentación Científico-Técnico de la Universidad de Jaén)

Ilustración 10: Objetivo con cámara de vídeo (Catálogo de servicios y tarifas de Centro de Instrumentación Científico-Técnico de la Universidad de Jaén)

3.1.1. Condiciones de medida.

- Microespectrómetro Raman dispersivo.

Las muestras medidas en este equipo fueron sometidas a una potencia de láser en un intervalo de 2-25 % para las muestras.

El tiempo de exposición al láser y el número de acumulaciones en la medida ha sido variable a lo largo de la medición, de modo que ha ido oscilando entre 30 y 40 segundos de exposición y entre unas 5-20 acumulaciones por medida.

- Espectrómetro FT-Raman.

La potencia del láser fue de 150-200 mW, y se realizaron 200 acumulaciones para eliminar posibles ruidos que pudieran interferir a la hora de la medida.

Para muestras tratadas se emplearon potencias de láser de 400-500 mW y, dependiendo del tiempo del que se disponía y de cómo de buenos eran los espectros, se realizaron entre 100 y 200 acumulaciones.

- Microespectrómetro Raman dispersivo confocal.

Todas las muestras que fueran medidas en este equipo estuvieron expuestas a una potencia del 50 % de láser.

Los tiempos de exposición y las acumulaciones iban variando, oscilando entre 30-50 segundos de exposición y entre 8 y 10 acumulaciones. Las acumulaciones se realizan para poder evitar la mayor parte del ruido posible.

Todas las medidas realizadas en este equipo fueron con un aumento de 20x, para poder ser posteriormente comparadas con las medidas en el microespectrómetro Raman.

3.2. Muestras.

Todas las muestras de huesos humanos utilizadas en este trabajo fueron facilitadas por el Prof. Dr. Miguel Botella, Catedrático de Antropología Física y Forense y Director del Laboratorio de Antropología de la Universidad de Granada. Las muestras pertenecen a las colecciones de dicho laboratorio y fueron suministradas previamente anonimizadas y autorizado su empleo por el Comité de Ética de Investigación Humana de la Universidad de Granada y la Comisión de Ética de la Universidad de Jaén.

Las muestras que se tratan en este experimento son tres: una muestra de cráneo y dos de fémur pertenecientes a individuos contemporáneos fallecidos por muerte natural.

Por sus características morfológicas y conociendo la clasificación de los huesos, podríamos decir que se trata de un hueso largo (fémur, en concreto es una muestra de la diáfisis del hueso), y un hueso plano (cráneo).

El código que fue establecido para nombrar las muestras fue el siguiente:

Los espectros de todas las muestras son nombradas, primero, con la letra H (hueso) y seguido de un número (correspondiente al orden en el que fueron tratadas y medidas). De este modo, de las muestras primeramente tratadas, el hueso de cráneo es codificado como H1 y el de fémur como H2; de la misma manera el segundo hueso de fémur recibido fue nombrado como H3.



Ilustración 11: Hueso de cráneo H1



Ilustración 12: Hueso de fémur H2.



Ilustración 13: Hueso de fémur H3 y las secciones en las que vino dividido.

Tabla 1: Descripción de los tratamientos aplicados, tipo de agua al que fueron expuestas a ebullición, tiempo de ebullición y equipos en donde se midieron las distintas muestras.

CÓDIGO	TRATAMIENTO PARA LA ELIMINACIÓN DE FLOURESCENCIA	TIPO DE AGUA EN EL QUE SE HA PUESTO A EBULLICIÓN	EQUIPOS EN LOS QUE SE MIDIERON	TIEMPO DE EBULLICIÓN (MIN)				
				0	30	60	120	240
H1	NO	DULCE	Microespectrómetro Raman dispersivo	SI	SI	NO	SI	SI
H2	NO	DULCE	Microespectrómetro Raman dispersivo	SI	SI	NO	SI	SI

H3	NO	DULCE	Microespectrómetro Raman dispersivo confocal	SI	NO	SI	SI	SI
			Espectrómetro FT-Raman					
	NO	SALADA	Microespectrómetro Raman dispersivo confocal	SI	NO	SI	SI	SI
			Espectrómetro FT-Raman					
	SI	DULCE	Espectrómetro FT-Raman	SI	NO	SI	SI	SI
	SI	DULCE	Microespectrómetro Raman dispersivo confocal	SI	NO	SI	SI	SI

Las muestras, una vez recibidas, tanto H1 como H2 y H3, fueron conservadas en el congelador a una temperatura de -20°C hasta que se empezaron a tratar.

Una vez sacados del congelador, entre tratamiento y tratamiento, se conservaron en el frigorífico a una temperatura de 5°C.

Todas las muestras (H1, H2 Y H3), antes de ser expuestas a ningún tipo de tratamiento, fueron medidas en fresco (con un previo lavado superficial en agua de la red de distribución para eliminar posibles interferencias que no procedan de la propia naturaleza de la muestra). De esta manera, H1 y H2 fueron medidas únicamente en el microespectrómetro Raman dispersivo mientras que H3 fue medida tanto en FT-Raman como en el microespectrómetro Raman dispersivo confocal.

3.3. Tratamiento.

3.3.1. En agua dulce.

Las muestras fueron expuestas a ebullición en agua dulce (procedente de la red de distribución) durante los periodos de tiempo indicados en la tabla del apartado “3.2. Muestras”. Para ello se añadió a un vaso de precipitado de 250 mL una cantidad de unos 200 mL de agua de la red de distribución y se sumergieron las muestras en el mismo. Seguidamente, fue colocado en la placa calefactora y la ebullición se llevó a cabo a una temperatura (indicada por la placa calefactora) de 250°C.

Tras cada exposición a ebullición, las muestras fueron seguidamente medidas, también indicado en el mismo apartado anteriormente mencionado.

3.3.2. En agua salada.

Para realizar la ebullición en agua salada, se ha querido asemejar el medio al agua marina. Para ello se ha realizado una disolución de NaCl al 35% (la indicada de un agua marina, sin tener en cuenta otros minerales).

Para la realización de la disolución, se pesaron 17,5 g de NaCl sólido en una balanza analítica, se añadió a un vaso de precipitado de 250 mL y se le fue añadiendo agua destilada hasta que se disolvió. Seguidamente fue añadido a un matraz aforado de 500 mL y enrasado con agua destilada.

Una vez realizada la disolución, se añadió a un vaso de precipitado de 250 mL una cantidad de unos 200 mL y se sumergió la muestra en el mismo. Seguidamente, fue colocado en la placa calefactora y la ebullición se llevó a cabo a una temperatura (indicada por la placa calefactora) de 250°C.

3.3.3. Limpieza previa.

Las muestras que se sometieron a este tratamiento para la eliminación de fluorescencia (Penel et al.,1998) fueron sumergidas, en vasos de precipitado de 150 mL, en 30 ml de peróxido de hidrógeno, acetona y nuevamente en peróxido de hidrógeno en periodos sucesivos de 2 horas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Antes de comenzar a interpretar los distintos espectros obtenidos, ha de explicarse cómo han sido codificados los mismos.

Seguido del código H (con su enumeración correspondiente) viene, separado por guiones, el estado en que se encuentra la muestra a la hora de la medición. Cuando se trata de hueso fresco, se emplea el código FRE; si ha estado expuesto a ebullición, se indica mediante el código EB y a continuación se indica el tipo de agua en el que ha sido tratado: DULC si se ha realizado en agua de la red de distribución (dulce) y SAL si se realizó en agua salada. En esta sección ha de señalizarse que hubo dos fracciones del hueso H3 que se denominaron como AP-1 y AP-2 al haber sufrido un tratamiento en base a peróxido de hidrógeno y acetona, el cual fue explicado en el apartado “3.3.3. Limpieza previa”.

Dentro de las muestras sometidas a ebullición, se indica, separado por guiones, el tipo de agua al que fueron expuestos (DULC para agua dulce y SAL para agua salada) y, seguidamente, un número que indica el tiempo (en minutos) que ha sido expuesto la muestra a ebullición.

Como puntualización y mayor aclaración a la hora de interpretar los espectros del hueso de cráneo, se ha añadido el código CONC (referido a la parte cóncava o exterior de la muestra), CONV (referido a la parte convexa o interior de la muestra) y LATE (referido a la parte lateral, que es la parte correspondiente al corte de la muestra).

Para terminar de codificar las muestras, al final del código se ha ido enumerando cada uno de los espectros.

Ejemplo explicativo: H1-EB-DULC-120-CONC-9. Este espectro es el espectro nueve (9) correspondiente a la parte cóncava (CONC) del hueso de cráneo (H1), que fue expuesto a ebullición (EB) en agua dulce o corriente (DULC) durante 120 minutos.

Los resultados obtenidos de esta investigación han sido clasificados y descritos en tres subapartados: estudios preliminares, medidas con FT-Raman y láser de 1064 nm y tratamiento para la eliminación de la fluorescencia.

4.1. Estudios preliminares.

Las muestras H1 y H2 fueron medidas mediante un microespectrómetro Raman, cuyas características y funcionamiento se describen en el apartado “3.1. Instrumentación”.

La muestra H1, al tratarse de la muestra de cráneo, fue medida tanto su parte cóncava, como convexa y la parte lateral (refiriéndonos a parte lateral como la zona de corte del hueso). La finalidad de medir distintas partes o zonas del hueso es conocer la mejor zona de medida de la muestra con la cual se obtenga un espectro que nos pueda proporcionar mayor información. Ha de decirse que los espectros de la zona lateral no sirvieron de ayuda en este estudio ya que se trata de una zona difícil a la vez de presentar surcos y muchas heterogeneidades.

Estos estudios han presentado numerosos problemas, de los cuales uno de los más significativos ha sido la presencia de un elevado fondo de fluorescencia en los espectros obtenidos el cual ha producido ruido al intentar eliminarla mediante corrección matemática.

A continuación van a exponerse los espectros más representativos de cada una de las exposiciones a ebullición, así como la muestra en fresco, en donde se indican los picos más representativos y los cuales suelen aparecer en cada uno de los espectros expuestos a esa ebullición.

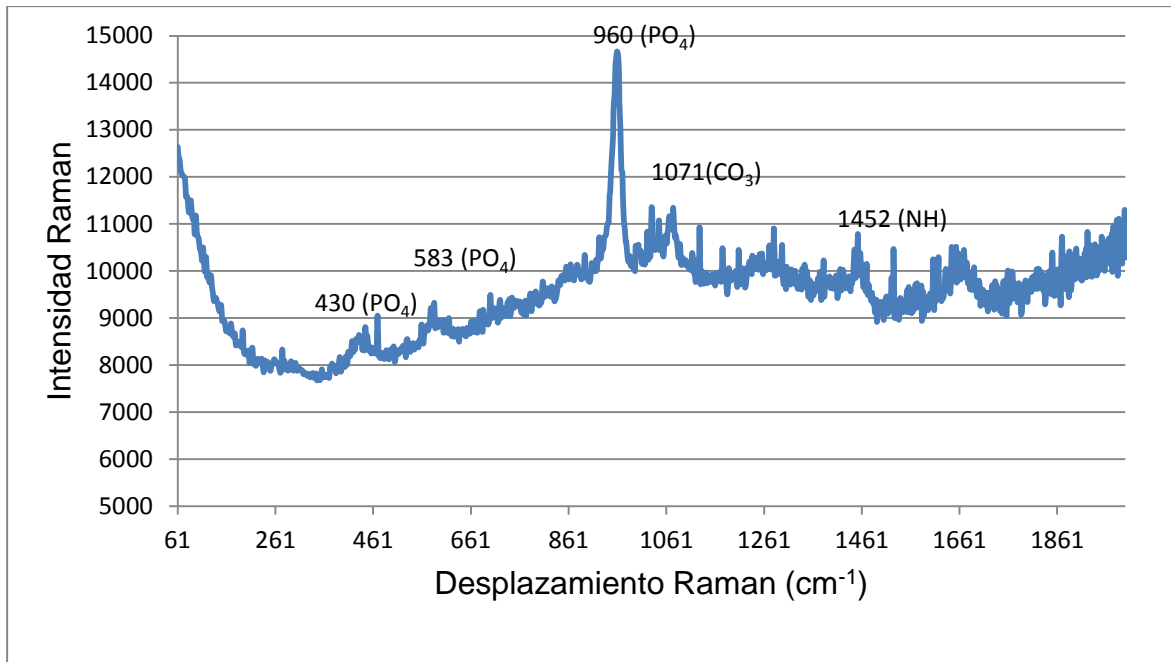


Ilustración 14: Espectro Raman obtenido de una zona del hueso de fémur H2 fresco, cuya codificación es H2-FRE-2.

En este espectro se observan los picos característicos a una muestra de hueso. Procedentes de la hidroxiapatita, encontramos grupos tales como los fosfatos (PO₄) los cuales aparecen en un desplazamiento Raman de 430 y 960 cm⁻¹, siendo este último el que aparece siempre a mayor intensidad en nuestros espectros. También se observa la aparición de un grupo carbonato (CO₃) en un desplazamiento de 1071 cm⁻¹ y un pico característico del grupo NH correspondiente a la estructura del colágeno a unos 1452 cm⁻¹ de desplazamiento Raman.

En la siguiente representación se va a ver la comparación entre los espectros de una misma muestra de hueso pero expuestos a un tiempo de ebullición distinto.

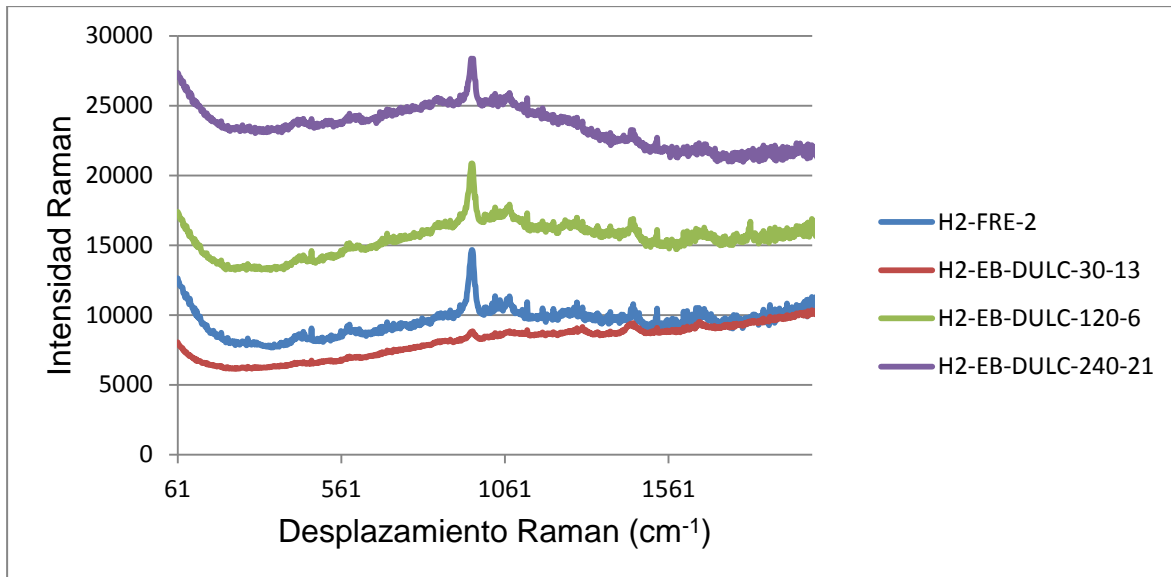


Ilustración 15: Espectros Raman obtenidos de la muestra H2 en fresco y sometidas a diferentes tiempos de ebullición en agua dulce.

Viendo estos espectros llegamos a la siguiente conclusión: como cada espectro fue obtenido midiendo a distintas condiciones, que eran aquellas que nos iba marcando la necesidad de la muestra dependiendo del tiempo de exposición a ebullición de la muestra, no se puede llegar a obtener conclusiones coherentes comparando las distintas intensidades de cada uno, sino que debemos de fijarnos en que, tras los tratamientos a distintas temperaturas, el hueso sigue presentando las mismas bandas Raman las cuales no se han visto desplazadas en el espectro. Viendo el ruido que presentan los espectros anteriores, se procedió a elegir una alternativa de medida con la cual se pudieran obtener espectros de los cuales pudiéramos tener mayor información de las muestras.

4.2. Medidas con FT-Raman y láser de 1064 nm.

En estas medidas se ha llevado a cabo la comparación de muestras tratadas en agua dulce y salada.

Como se ha indicado en apartado “3.1. Instrumentación”, el empleo de esta técnica ha sido elegido como complemento a la microespectroscopía Raman. Esto ha sido decidido así porque el microespectrómetro Raman tiene un láser de 785 nm el cual es más energético y aumenta la probabilidad de que se produzcan transiciones electrónicas que puedan causar fluorescencia. Además el detector

CCD es poco sensible en la zona de vibración de los grupos CH. El FT-Raman posee un láser de 1064 nm, que está más cercano a la zona del infrarrojo y es menos energético que el láser de 785 nm, lo que disminuye la probabilidad de producir la fluorescencia en estas muestras.

A continuación se van a exponer dos espectros de muestras hervidas durante el mismo tiempo y medidas en el mismo equipo, pero la ebullición una fue en agua dulce y la otra en agua salada.

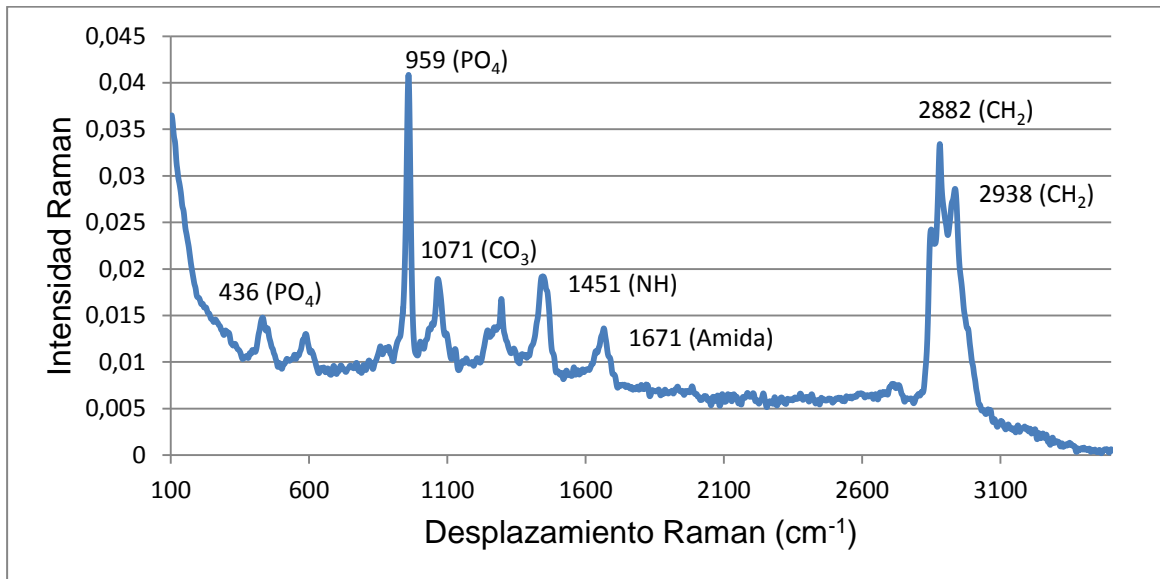


Ilustración 16: Espectro Raman obtenido de una muestra que fue hervida en agua salada durante 120 minutos y medida en FT-Raman.

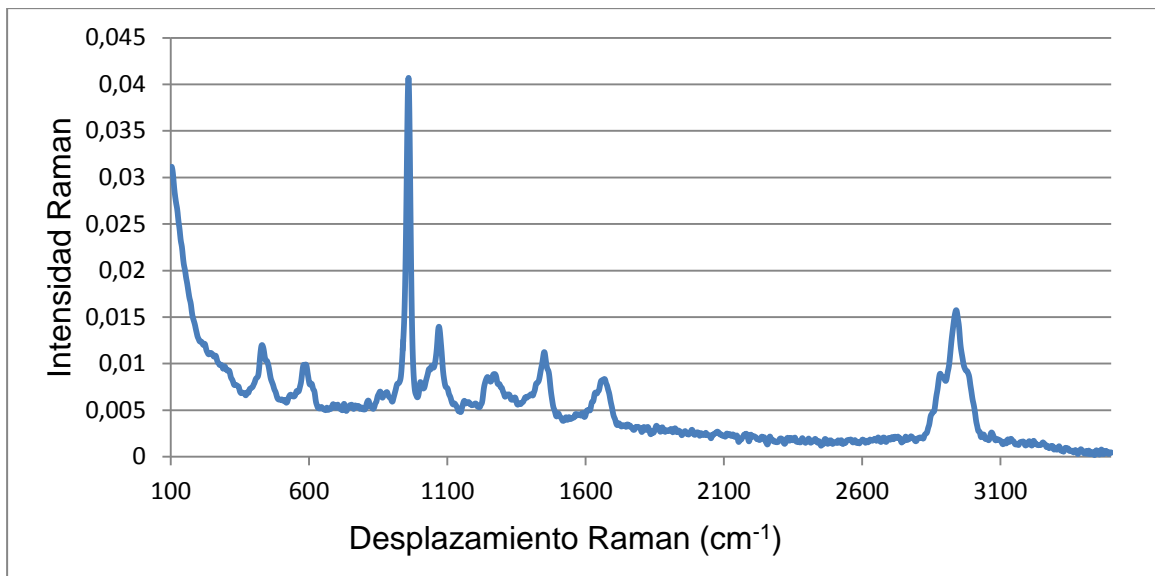


Ilustración 17: Espectro Raman obtenido de una muestra hervida en agua dulce, procedente de la red de distribución, durante 120 minutos y medido en el espectrómetro FT-Raman.

A continuación se expone una figura en donde se ven tres espectros de la muestra medida en fresco en el espectrómetro FT-Raman en distintas zonas.

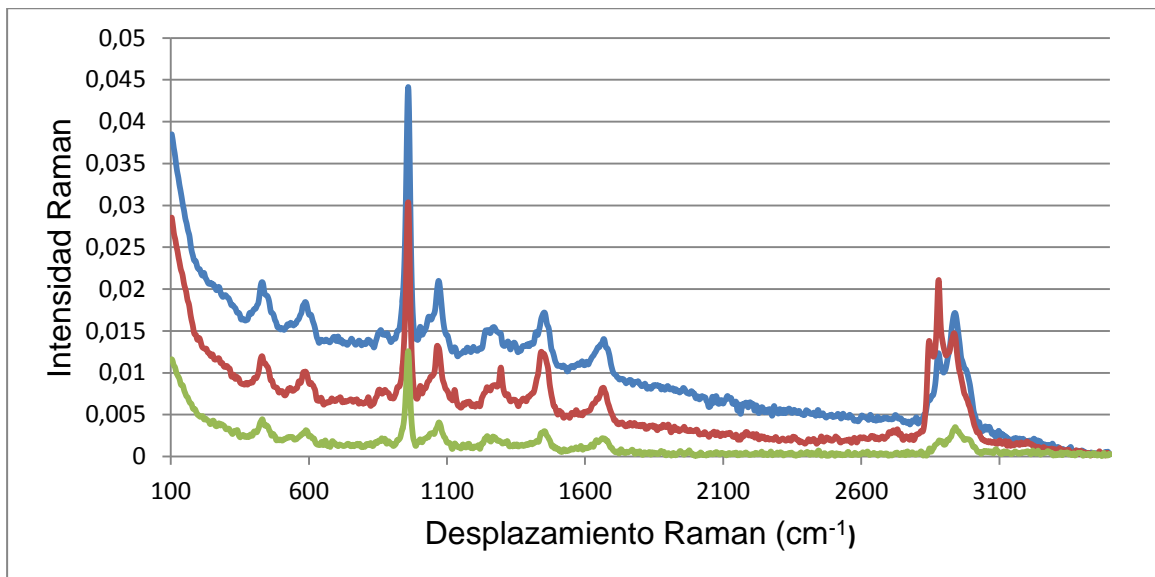


Ilustración 18 Espectros Raman obtenidos de la muestra H3 en fresco medidos en el espectrómetro FT-Raman.

Podemos observar fijándonos en estos espectros como en la zona de CH intenso se ven variedades entre ellos, debido seguramente a que lo que se ve son restos de tejido del cuerpo y no restos óseos

4.3. Tratamiento para la eliminación de la fluorescencia.

Siguiendo el artículo de G. Penel se propone utilizar un tratamiento basado en peróxido de hidrógeno y acetona para eliminar los restos de tejidos que provocan la fluorescencia.

En este apartado se ha llevado a cabo la comparación de la misma muestra antes y después del tratamiento en los distintos espectrómetros empleados.

A dos secciones de la muestra H3 se les aplicó este tratamiento, del cual se obtuvieron buenos resultados, ya que se consiguió eliminar la fluorescencia que venía siendo un problema en lo que respectaba al ruido en los espectros anteriormente obtenidos.

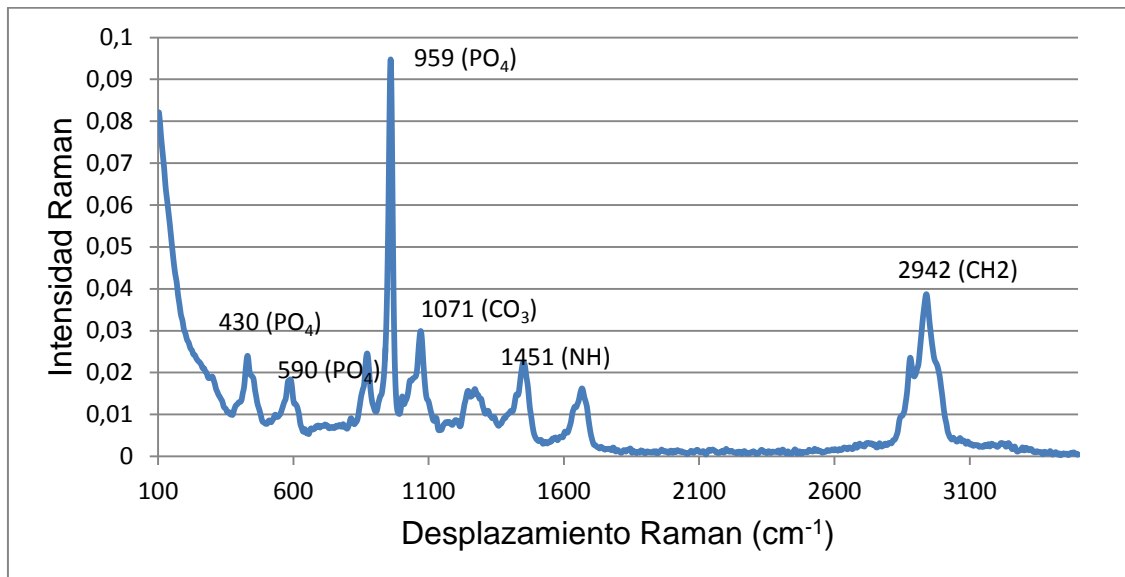


Ilustración 19: Espectro Raman obtenido de una muestra medida tras el tratamiento con FT-Raman, correspondiente al código H3-AP-1-FRE-2.

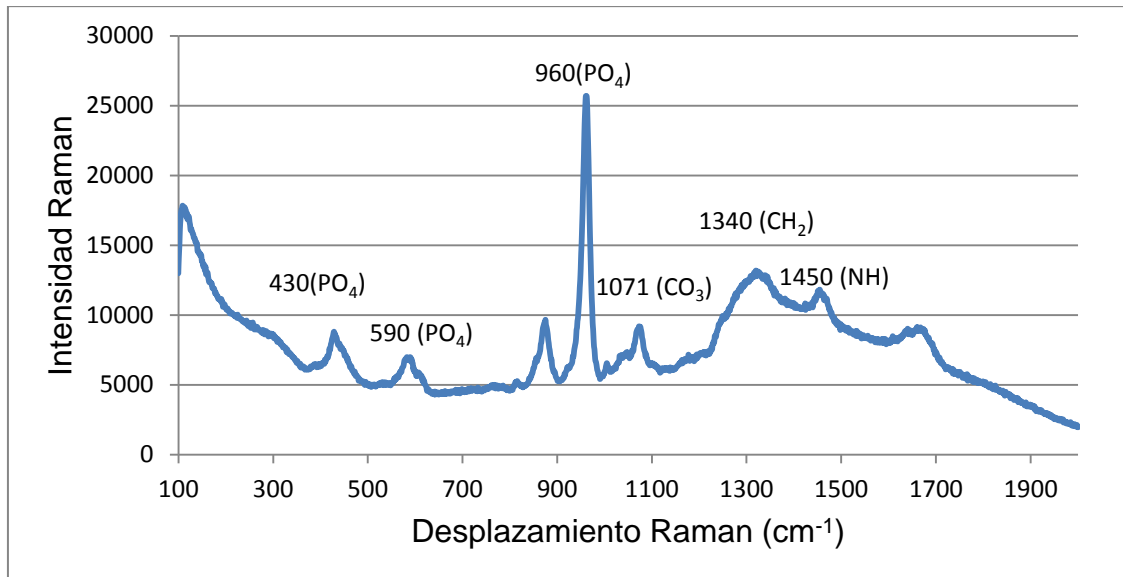


Ilustración 20: Representación de una muestra medida tras el tratamiento con el microespectrómetro Raman confocal, correspondiente al código H3-AP-2-FRE-2.

En la siguiente figura se va a representar dos espectros, uno obtenido de la medición de la muestra antes de ser expuesto al tratamiento de la eliminación de la fluorescencia y otro tras el tratamiento en espectroscopía FT-Raman. Se observa que, aun empelando condiciones similares de medidas para ambas muestras, en aquella que no está tratada no se observan los picos correspondientes a grupos funcionales del colágeno y la hidroxiapatita con tanta claridad como en el espectro de la muestra tratada. También se ve como en la muestra tratada, en el espectro aparecen los picos a mayor intensidad y se minimiza en gran parte el fondo del espectro debido a la fluorescencia.

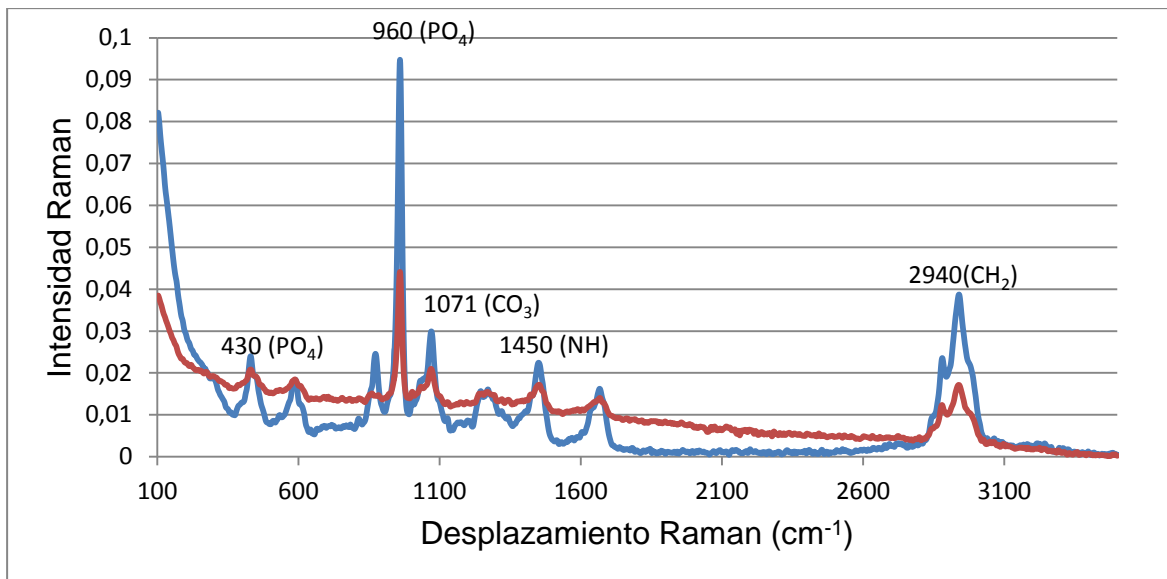


Ilustración 21: Representación del espectro H3-AP-1-FRE-2 (en azul) y H3-FRE-3 (en rojo)
 En la siguiente figura se va a representar la mayor parte de los espectros realizados en FT-Raman, antes y después del tratamiento.

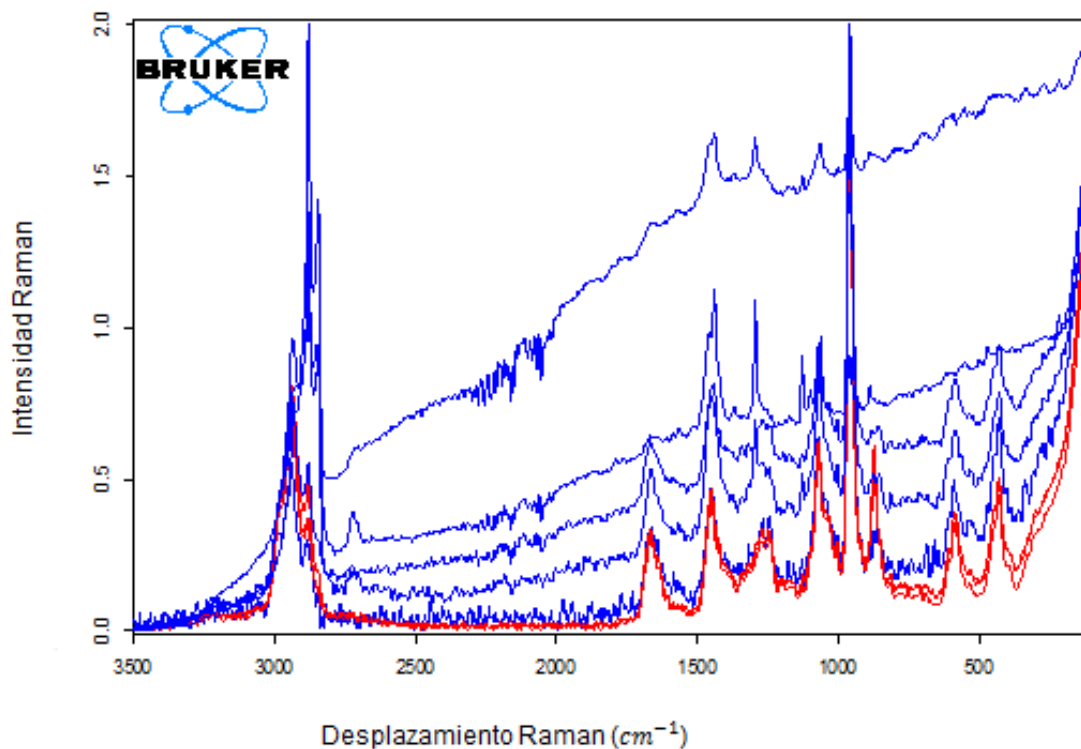


Ilustración 22: Representación de espectros medidos en FT-Raman. En rojo aparecen aquellos espectros a cuyas muestras se les ha aplicado el tratamiento y en azul, aquellos espectros cuyas muestras no fueron tratadas.

Podemos apreciar cómo, al aplicarle el tratamiento a las muestras, el espectro presenta disminución en el fondo de fluorescencia y también los picos se aprecian con mayor claridad en el espectro.

5. CONCLUSIONES.

Todos estos estudios realizados llevan a pensar que para obtener buenos resultados de los espectros sería necesario aplicarle a todas las muestras a medir el tratamiento indicado, ya que el hueso tal cual contiene una película de restos de materia orgánica no propias del hueso que nos impiden medirlo tal cual. Sin embargo, se ha visto que en espectros cuyas muestras no fueron tratadas aparece un pico a unos 2847 cm^{-1} y que en espectros donde la muestra si ha sido tratada, desaparece ese pico. Una explicación que podría darse sería la precipitación del carbonato cálcico del agua corriente, aunque para poder afirmar esto deberían de hacerse más medidas de ambas muestras y en distintas zonas.

También se ha llegado a la conclusión de que las medidas con espectroscopía FT-Raman y láser de 1064 nm nos proporciona unos espectros en los que la zona de más de 2000 nm es apreciable (al contrario que ocurre con la microespectroscopía dispersiva) lo que hace que las vibraciones procedente de CH sean vistas.

Por último decir que para poder obtener información significativa de los espectros comparándolos entre sí, habría que hacer muchas más medidas de la muestra, así como un mapeo, ya que se trata de muestras con una gran heterogeneidad.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Bosch, P., Alemán, I., Moreno-Castilla, C., Botella, M., 2011. Boiled versus unboiled, a study on neolithic and contemporary human bones. *Journal of Archaeological Science* 38, 2561-2570.

Cáceres, I., Lozano, M., Saladié, P., 2007. Evidence for brozen age cannibalism in El Mirador Cave (Sierra de Atapuerca, Burgos, Spain). *American Journal Of Physical Anthropology* 133, 899-917.

Hurlbut, S.A., 2000. The taphonomy of cannibalism: a review of anthropogenic bone modification in the American southwest. *International Journal of Osteoarchaeology* 10, 4-26.

Hellauer, H., Winkler, R., 1975. Denaturation of collagen fibers in NaI, NaCl and wáter of different pH values as studied by differential scanning calorimetric measurements. *Connective Tissue Research* 3, 221-230.

Jiménez Brobeil, S.A., 1990. Rituales funerarios neolíticos en la alta Andalucía. Estado actual de la cuestión. *Zephyrus XLIII*, 125-130.

Malgosa, A., Piga, G., Mazzarello, V., Bandiera, P., Enzo, S., 2008. Estudio de cremaciones españolas a través del análisis de difracción de rayos X (XRD). In: Nieto Amada, J.L., Obón Nogués, J.A., Baena Pinilla, S. (Eds.), *Genes, ambiente y enfermedades en poblaciones humanas*. Prensas Universitarias de Zaragoza, Zaragoza, Spain, pp.331-340.

Penel, G., Leroy, G., Bres, E., 1997. New preparation method of bone samples for Raman Microspectrometry. *Society for Applied Spectroscopy* 1998.

Roberts, S.J., Smith, C.I., Millard, A., Collins, M.J., 2002. The taphonomy of cooked bone: characterizing boiling and its physic-chemical effects. *Archaeometry* 44, 485-494

Ross-Pawlina, *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*, Editorial Panamericana, 2013, Sexta Edición

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., *Fundamentos de Química Analítica*, 1994, Cuarta Edición.

Trujillo-Mederos, A., Alemán, I., Botella, M., Bosch, P., 2012. Changes in human bones boiled in seawater. *Journal of Archaeological Science* 39, 1072-1079.

White, E.;, Hannus, L.A., 1983. Chemical weathering of bone in archaeological soils. *American Antiquity* 48, 316-322.