

127



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO CALORIMETRICO DE COLAGENA
TIPO I PRESENTE EN HUESO Y SU APLICACION
COMO TECNICA DE ANALISIS DE RESTOS OSEOS
DE INTERES ARQUEOLOGICO Y PALEONTOLOGICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

LUIS FERNANDO ANDRÉS AGUIRRE BELTRAN



ASESOR: DR. LAURO BUCIO GALINDO

FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



MEXICO, D.F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Estudio Calorimétrico de Colágena Tipo I presente en Hueso y su Aplicación
como Técnica de Análisis de Restos Oseos de Interés Arqueológico y Paleontológico.

realizado por Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán

con número de cuenta 9650394-2 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Lauro Bucio Galindo

Lauro Bucio

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Luis Felipe Jiménez García

Propietario

Dr. Ramiro García García

Suplente

M. en C. José Ocotlán Flores Flores

José Ocotlán Flores Flores

Suplente

M. en C. Vicente Castrejón Téllez

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Patricia Ramos Morales
Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

*A mis padres,
José Antonio y Olga.
A mis hermanos,
July y a Pepo.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lauro Bucio Galindo por su paciencia y amistad, por la dirección del presente trabajo y por haber abierto las puertas en el laboratorio de metalurgia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A los sinodales: Dr. Ramiro García García, Dr. Luis Felipe Jiménez García, M. en C. José Ocotlán Flores Flores y M. en C. Vicente Castrejón Téllez por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Francisco Aranda Manteca por las muestras fósiles que amablemente nos donó, al M. en C. José Ocotlán Flores Flores por los análisis de Espectroscopia Infrarroja y los análisis Termogravimétricos, a Antonio Gómez Cortéz por los análisis de Cromatografía de Gases, así mismo a Dolores Tenorio del ININ por las muestras de mamut. Al Arqueólogo Luis A. López Wario, Director de Salvamento Arqueológico, a Teresa Castillo Mangas, encargada de la excavación de Xochimilco, a Mariluz Moreno Cabrera, Subdirectora del Registro Arqueológico del INAH Chimulistac, a Heju Chang por las muestras óseas aportadas.

Al apoyo económico de la DGAPA a través de los proyectos PAPIIT IN-113199 "Análisis de Material Óseo y Síntesis de Nuevas Cerámicas Magnéticas y Biocerámicas: Determinación de sus Estructuras Cristalinas, y Tipificación de sus Propiedades Magnéticas y Mecánicas" y PAPIIT IN-120801 "Análisis de Material Biológico, Materiales Cristalinos Sintéticos y Amorfos: Relación Estructura-Propiedades Físicas".

Un especial agradecimiento a Miguel Angel Peña Rico, Alejandro Heredia Barbero, José Antonio Villareal, Rodrigo Velázquez, Eduardo Villareal, Erick Juárez, Ivonne Rosales y Julio Reyes por sus comentarios y críticas al presente trabajo, a Irma Orozco y Angel Osorio del Instituto de Física por toda la ayuda prestada. Al Dr. Eligio Orozco por los comentarios y críticas al presente y anteriores trabajos.

A Miguel Bustos por brindarnos siempre la mejor ayuda y a Enrique Hernández por el apoyo otorgado, a ambos por refrescarnos el ánimo en los momentos de mayor incertidumbre.

A los compas de la Facultad de Ciencias y de la Prepa por su amistad.

RESUMEN

El tejido óseo resulta un material de interés en diferentes áreas de investigación, desde la biología, la paleontología, la medicina y la arqueología hasta la ciencia de materiales. Se encuentra compuesto principalmente de una fase orgánica y otra inorgánica, la primera constituida por colágeno tipo I y la segunda por cristales de hidroxiapatita. Mediante distintas técnicas, principalmente calorimetría, se investigaron las propiedades térmicas del colágeno en relación con los cristales de hidroxiapatita de muestras óseas actuales, principalmente aquellas que resultan de su degradación y combustión total. Posteriormente, se aplicó el anterior análisis a un conjunto de restos óseos de interés arqueológico y paleontológico con el fin de conocer la aplicación de la técnica de calorimetría al fechamiento de muestras óseas de diferente antigüedad.

Empleando la técnica de calorimetría y el análisis térmico gravimétrico se analizó el colágeno presente en muestras óseas actuales en presencia y en ausencia de la fase cristalina, obteniéndose la temperatura T_{max} asociada al valor máximo de la señal exotérmica y su correspondiente ΔH de combustión. Así mismo, mediante cromatografía de gases y espectroscopía infrarroja, se estudió el proceso de combustión de la proteína. Los valores de T_{max} y ΔH de combustión muestran que el colágeno en presencia de la hidroxiapatita tiene una menor estabilidad térmica en comparación con la del colágeno extraído, mediante distintos métodos, de las mismas muestras óseas, lo cual se atribuye a un efecto del cristal sobre la proteína.

Al aplicar la técnica de calorimetría a los restos óseos de interés arqueológico y paleontológico se obtuvieron los valores de ΔH de combustión, los cuales variaron de acuerdo a la antigüedad de la muestra. En el caso de las muestras arqueológicas se ajustaron distintas curvas de decaimiento exponencial que representan el comportamiento global del conjunto de muestras analizadas. De estas curvas se obtuvo el valor de Tau (τ), el cual está definido como, el tiempo de vida media del colágeno presente en un conjunto de muestras obtenido para cada una de las técnicas empleadas en su medición, es decir, el valor de Tau (τ) está en función de la sensibilidad que tenga cada técnica para medir la presencia del colágeno en el tejido óseo. Este valor resulta útil para comparar la calorimetría con otras técnicas que se han empleado en el laboratorio para el análisis de restos óseos, como son la difracción de rayos X y el análisis elemental mediante técnicas nucleares. Dicha comparación demostró que la calorimetría resulta una técnica más sensible para detectar el contenido de materia orgánica en el material óseo, aunque no es específica para el caso del colágeno.

Las muestras paleontológicas tuvieron un comportamiento completamente distinto de otras muestras lo cual dificultó su interpretación. Aun así se ajustó una curva de decaimiento exponencial y se obtuvo el valor de Tau (τ). Se encontró que la curva de decaimiento exponencial no corresponde al ritmo de degradación del colágeno es estas muestras, por lo cual se plantea la posibilidad de ajustar una curva distinta como sería el caso de una sigmoideal.

ÍNDICE

1. GENERALIDADES DEL HUESO, COLÁGENO E HIDROXIAPATITA

- 1.1. Hueso.
- 1.2. Colágena.
- 1.3. Hidroxiapatita.
- 1.4. Trabajos previos realizados en el laboratorio.
 - 1.4.1. Muestras Óseas Actuales.
 - 1.4.2. Muestras Óseas Arqueológicas.
 - 1.4.3. Muestras Óseas Paleontológicas.
- 1.5 Características Generales del Colágeno de Hueso Antiguo.

2. ASPECTOS TEÓRICOS DE LOS MÉTODOS EXPERIMENTALES

- 2.1. Aspectos Termodinámicos.
- 2.2. Calorimetría de Barrido Diferencial.
- 2.3. Análisis Térmico Gravimétrico.
- 2.4. Espectroscopía Infrarroja.
- 2.5. Cromatografía de Gases.

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- 3.1. Manejo del material óseo para su análisis.
- 3.2. Muestras Óseas.
- 3.3. Calorimetría de Barrido Diferencial.
- 3.4. Análisis Térmico Gravimétrico.
- 3.5. Espectroscopía Infrarroja.
- 3.6. Cromatografía de Gases.

4. RESULTADOS

- 4.1. Muestras Óseas Actuales.
 - 4.1.1. Calorimetría de Barrido Diferencial.
 - 4.1.2. Análisis Térmico Gravimétrico.
 - 4.1.3. Espectroscopía Infrarroja.
 - 4.1.4. Cromatografía de Gases.
- 4.2. Colágeno tipo I.
 - 4.2.1. Calorimetría de Barrido Diferencial.
 - 4.2.2. Análisis Térmico Gravimétrico.
 - 4.2.3. Espectroscopía Infrarroja.
- 4.3. Hidroxiapatita.
 - 4.3.1. Calorimetría de Barrido Diferencial.
 - 4.3.2. Análisis Térmico Gravimétrico.
 - 4.3.3. Espectroscopía Infrarroja.
- 4.4. Muestras Arqueológicas.
 - 4.4.1. Calorimetría de Barrido Diferencial.
 - 4.4.2. Análisis Térmico Gravimétrico.
 - 4.4.3. Espectroscopía Infrarroja.
- 4.5. Muestras Paleontológicas.
 - 4.5.1. Calorimetría de Barrido Diferencial.

5. DISCUSIÓN

5.1 Estabilidad Térmica del Colágeno Tipo I.

5.2 Degradación y Combustión del Colágeno Tipo I.

5.3 Aplicación de la Calorimetría al Estudio de Muestras Ósecas Arqueológicas.

5.4 Aplicación de la Calorimetría al Estudio de Muestras Ósecas Paleontológicas.

6. CONCLUSIÓN

REFERENCIAS

APÉNDICES

INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es una estructura biológica que ha estado sujeta a investigación en diferentes áreas como son arqueología, medicina, biología, ciencia de materiales, etc. debido principalmente a que presenta funciones tanto estructurales como fisiológicas; tiene la posibilidad de permanecer durante largos periodos de tiempo a diferencia de otros tejidos y además sirve de modelo en el desarrollo de biomateriales para implantes, prótesis u otras aplicaciones. Se encuentra constituido por una fase orgánica y una inorgánica, que corresponden al colágeno tipo I y al carbonato de hidroxiapatita $[Ca_5(PO_4)_3CO_3]OH$, (HAp), respectivamente. Existen un gran número de estudios sobre colágeno debido a su abundancia y la función estructural que desempeña en los organismos vivos y debido a que se encuentra así mismo relacionado con diferentes enfermedades humanas, algunas de ellas hereditarias. Por lo anterior, se requiere de un conocimiento profundo de la estabilidad estructural del colágeno con el fin de entender la relación que guarda con la fase mineral, la hidroxiapatita. Lo cual permitiría comprender las características intrínsecas que presenta el hueso como un tejido óseo junto con sus diferentes funciones.

Como técnica de caracterización se ha empleado la calorimetría en el estudio de proteínas para conocer su estabilidad térmica en solución, centrándose la mayoría de las investigaciones en el proceso de desnaturalización, en el intervalo de temperatura de los 20 a los 80 °C. Sin embargo ha sido poco empleada en el estudio de la degradación y combustión de diferentes biomoléculas, por no decir sólo proteínas. El estudio del proceso de degradación y combustión del colágeno mediante la calorimetría, ofrece la posibilidad de conocer la relación que guarda con la hidroxiapatita, debido a que la estabilidad térmica de una proteína tiene una estrecha relación con sus características estructurales, como son las interacciones químicas que estabilizan a la molécula así como el ambiente que la rodea. La estructura molecular del colágeno tipo I ha sido ampliamente investigada mediante diferentes técnicas (Prockop & Fertala 1998; Beck & Brodsky 1998; Persikov et al. 2000). De esta manera la caracterización térmica del tejido óseo mediante el uso de otras técnicas analíticas tales como espectroscopía infrarroja y cromatografía de gases abre la posibilidad de conocer la naturaleza y comportamiento del colágeno presente en muestras óseas de interés para distintas áreas como la medicina, la paleontología, la arqueología, etc.

En la arqueología y la paleontología, uno de los materiales de más estudio son los restos óseos que se encuentran ya sea en entierros o en distintas formaciones geológicas, según sea el caso. Respecto al estudio de huesos arqueológicos, existe la posibilidad de establecer un método de fechamiento que permita determinar la antigüedad de las muestras halladas. Por otro lado, en la paleontología, el establecer la edad de un fósil es importante al determinar ciertas características de la especie, a la cual, corresponde el fósil en estudio. Determinar la estabilidad que presenta el colágeno en el tejido óseo, permitirá más adelante, analizar algunos factores, principalmente ambientales como pH, humedad, temperatura, tipo de suelo, etc., que presentan un efecto sobre la diagénesis del colágeno tipo I en el hueso.

Por lo anteriormente expuesto, los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

- a) Caracterizar la estabilidad térmica que presenta el colágeno tipo I cuando se encuentra en presencia y en ausencia de la fase mineral, mediante el uso de técnicas calorimétricas.
- b) Caracterizar el proceso de degradación y combustión del colágeno tipo I en presencia de la fase mineral, es decir en el hueso.
- c) Interpretar las posibles diferencias en la estabilidad térmica de la proteína, mediante el uso de la Espectroscopía Infrarroja y la Cromatografía de Gases.
- d) Aplicar la Calorimetría al estudio de muestras de tejido óseo de interés arqueológico y paleontológico.
- e) Obtener la relación de los valores de entalpía de muestras de diferentes antigüedades.
- f) Proponer una curva que represente las diferencias de entalpía con respecto al tiempo para las muestras arqueológicas y paleontológicas.

1. GENERALIDADES DEL HUESO, COLÁGENO E HIDROXIAPATITA.

El hueso y el cartilago, llamados también tejido óseo y tejido cartilaginoso, son dos formas especializadas de tejido conectivo. Así mismo, el colágeno denso es una variante de tejido conectivo común y por ende es no especializado. El tejido óseo representa la parte más importante del esqueleto, a pesar de su dureza y resistencia, posee cierta elasticidad. Como se mencionó anteriormente, al igual que el cartilago, el tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo denso, el cual, provee al esqueleto de la fuerza necesaria para funcionar como sitio de inserción y sostén del peso para los músculos, así como dar cierta rigidez al organismo. Además, tiene funciones de protección al rodear al cerebro, médula espinal y parte de los órganos en el tórax y el abdomen.

1.1. Hueso.

El hueso, es una forma especializada de tejido conectivo en el cual, la matriz extracelular se encuentra mineralizada, otorgándole fuerza y rigidez al esqueleto, al mismo tiempo, participa en la homeostasis del calcio en el cuerpo. Está compuesto de una matriz orgánica en donde se depositan sales de calcio. El colágeno tipo I constituye aproximadamente el 95% de dicha matriz, el 5% restante, está compuesto de proteoglicanos y diferentes tipos de proteínas distintas al colágeno. Las sales cristalinas que se depositan sobre la matriz orgánica bajo control celular, se conforman principalmente de calcio y fosfatos en la forma de carbonato de hidroxipatita.

Morfológicamente, existen dos formas de hueso: el cortical o compacto y el trabecular o esponjoso (ver Fig.1). En el hueso cortical, las fibrillas de colágeno que se encuentran densamente empaquetadas, forman laminillas concéntricas, mientras que las fibrillas en las láminas adyacentes se organizan de forma paralela. En el hueso trabecular, la matriz se encuentra poco organizada, lo cual, provoca que se genere una estructura porosa; las diferencias entre estos dos tipos de huesos son de tipo estructural y funcional. Las diferencias en los arreglos estructurales están relacionados con sus respectivas funciones. El hueso cortical tiene funciones mecánicas y de protección, mientras que el hueso trabecular presenta funciones metabólicas.

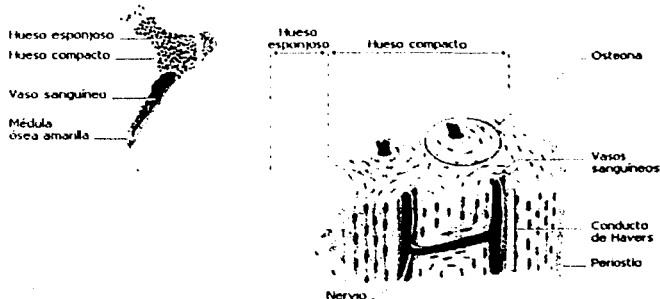


Fig. 1. Esquema de hueso esponjoso y compacto.

En el hueso, se encuentran presentes cuatro diferentes tipos celulares, los osteoblastos, osteoclastos y células de revestimiento que se encuentran presentes en la superficie del hueso, mientras los osteocitos se hallan el interior. Los osteoblastos son los responsables de la producción de la matriz del hueso, secretan la colágeno tipo I y otras proteínas. Así mismo, regulan la mineralización de la matriz. El osteocito se encarga del mantenimiento de la matriz, ya que tiene la capacidad de sintetizarla y reabsorberla. Las células de revestimiento, son células inactivas que cubren la superficie del hueso que no se encuentra en formación o reabsorción. Por otro lado, los osteoclastos tienen la función de reabsorber el hueso. Entre todos se lleva a cabo la coordinación de las actividades celulares durante el desarrollo y maduración del hueso.

La formación del tejido óseo se da mediante un proceso directo llamado intramembranoso o mediante un proceso indirecto conocido como endocondrial. Ambos requieren de un sistema vascular bien desarrollado para elaborar y posteriormente mineralizar a la matriz extracelular. La osificación intramembranosa, se lleva a cabo durante el desarrollo embrionario, mediante la transformación directa de las células del mesenquima en osteoblastos. Este tipo de osificación para huesos enteros está restringida para huesos craneales, faciales, partes de la mandíbula y la clavícula. Los huesos que participan en articulaciones y sostienen el peso del organismo, se forman a partir de osificación endocondrial, en este caso, el mesenquima embrionario se transforma en cartilago que rige la posición y la forma que el futuro hueso tendrá.

1.2. Colágeno.

El colágeno tipo I es la proteína extracelular más abundante en el tejido óseo. La familia de los colágenos puede ser definida como un grupo de proteínas estructurales de la matriz extracelular que contienen uno o más dominios que presentan la conformación de triple hélice. El colágeno tipo I junto con la tipo II, tipo III, tipo V y tipo IX forman el grupo de los colágenos fibrilares, su característica distintiva es que consisten en una extensa y continua triple hélice que se organizan en fibrillas y fibras. Estas presentan una fuerza de tensión muy alta y proporcionan la base estructural del hueso, la piel, arterias y venas, intestinos y cápsulas fibrosas de algunos órganos. El colágeno tipo I es la proteína más abundante en vertebrados, encontrándose en hueso, tendones, ligamentos y piel.

El colágeno tipo I se traduce como un propéptido el cual, por acción de proteasas específicas pierde la región anterior y posterior de la molécula, dando origen a la molécula de colágeno, la cual, se acomoda en las fibras de forma paralela, cada una con una longitud de 300 nm y un espacio entre el final de una e inicio de otra, el carboxilo terminal y amino terminal respectivamente, de 40 nm. Este arreglo explica el bandeoado blanco y negro que presenta la molécula al ser observada en el microscopio electrónico.

Se sabe que la estructura molecular de el colágeno tipo I, está compuesta por dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ que juntas forman una triple hélice derecha, mientras que individualmente forman hélices izquierdas. Cada cadena esta compuesta por una serie de tres residuos de aminoácidos, Gly-X-Y, donde "X" por lo común es prolina y "Y" por lo común es hidroxiprolina. Estos dos residuos se encuentran situados al exterior de la triple hélice, mientras que la glicina, por ser el aminoácido más pequeño se acomoda

adecuadamente en el centro de la estructura (Bilezikian, 1996). Existen parámetros estructurales con respecto al colágeno (Beck and Brodsky, 1998):

Secuencia	(Gly-X-Y) _n
Parámetros de hélices simples	
Dirección de torsión	izquierda
Residuos por cada vuelta	3.33
Altura por residuo (Å)	2.86
Radio de la hélice, C α (Å)	1.5
Parámetros de triple hélice	
Dirección de torsión	derecha
Radio de la triple hélice (Å)	2.8
Longitud de la triple hélice (Å)	85.5

El colágeno tipo I tiene una alta estabilidad térmica debido principalmente al arreglo estructural que presenta y a los enlaces químicos, débiles y fuertes, como son los puentes de hidrógeno mediados por las moléculas de agua. Los puentes de hidrógeno se encuentran entre las cadenas que forman la triple hélice, formados entre los grupos amino y carboxilos del esqueleto de la cadena polipeptídica. Existen enlaces covalentes entre las triple hélices adyacentes cuando forman fibrillas, y en la región de los espacios entre el final de una triple hélice y el inicio de la siguiente.

El alto contenido de Gly, Pro y Hyp en el colágeno sugiere que la conformación polipeptídica del esqueleto se parece a las hélices de poliprolina II y poliglicina II. La molécula de colágeno tipo I no ha podido ser cristalizada. Solamente se han podido cristalizar péptidos tipo colágeno sintetizados específicamente con ese propósito (ver Fig.2).

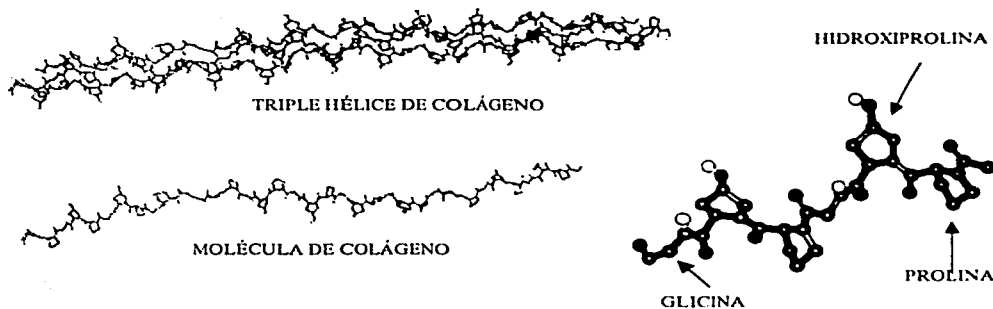


Fig. 2. Esquemas de la molécula de colágeno.

El colágeno de hueso presenta entrecruzamientos característicos de los tejidos a base de colágenos. Dichos entrecruzamientos, surgen a partir de la acción de la lisil oxidasa que actúa oxidando los residuos de hidroxilisina y lisina que se encuentran presentes en la región terminal de la triple hélice, lo cual, genera grupos aldehído en sus respectivas cadenas laterales, lo que permite que interactuen con otros residuos de hidroxilisina y lisina (Fig. 3). Estas últimas reacciones que se llevan a cabo para originar el entrecruzamiento se menciona son espontáneas (Eyre, 1996). Los entrecruzamientos son de especial importancia ya que le otorgan una alta estabilidad a las fibrillas de colágeno. Se menciona que posteriormente puede llevarse a cabo un tercer entrecruzamiento, obteniéndose finalmente dos clases de entrecruzamientos tipo pirridinolina, como la hidroxilisil pirridinolina y la lisilpirridinolina. Los entrecruzamientos tipo pirridinolina son característicos del colágeno de hueso, aunque se encuentran en concentraciones bajas debido a que su formación requiere de un proceso denominado maduración que no se lleva a cabo fácilmente debido al proceso de mineralización de las fibras y a la constante reabsorción y formación del tejido óseo.

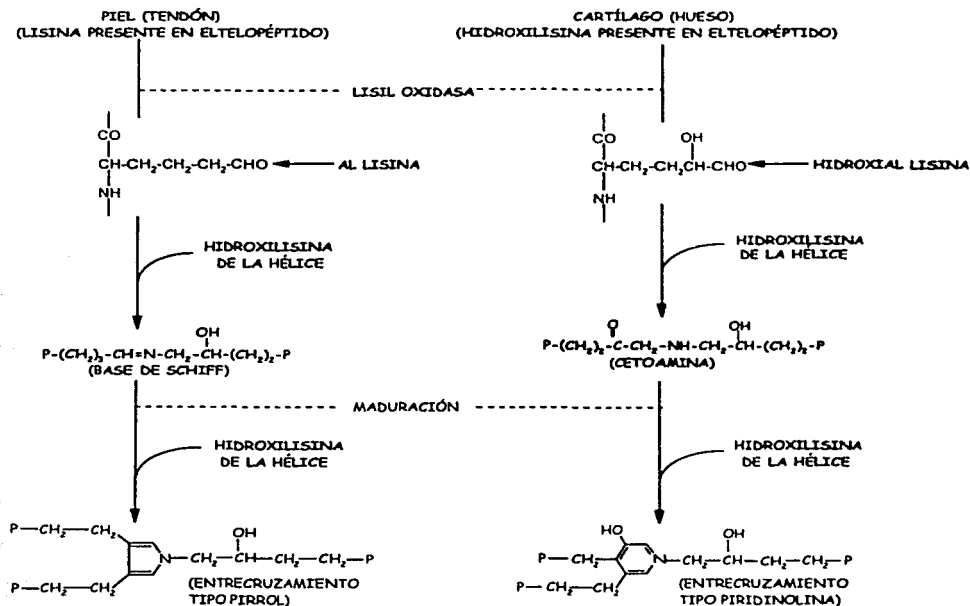


Fig. 3. Diagrama de la formación de los entrecruzamientos entre moléculas de colágeno.

1.3. Hidroxiapatita

Con respecto a la estructura molecular y la nucleación de cristales de carbonato de hidroxiapatita se parte de la estructura atómica de la hidroxiapatita (HAp), de la cual se postula que por medio de sustituciones de distintos grupos se origina el carbonato de HAp; la estructura de la HAp se obtiene a partir de análisis de patrones de difracción de rayos X, la descripción del cristal se basa en la caracterización de la celda unidad, la cual tiene la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, su estructura cristalina pertenece al sistema hexagonal con simetría descrita por el grupo espacial $P6_3/m$ (Fig.4). Presenta dos tipos de calcio, Ca(1) que forma poliedro de coordinación 9 y Ca(2) coordinado con 6 átomos de oxígeno y un grupo OH- con el cual este último Ca completa un poliedro de coordinación 7. También presenta fosfatos PO_4^{3-} que unen las columnas de Ca(1) mediante tres oxígenos en una columna y otro oxígeno en otra (Heredia, 1998). Se ha propuesto que la nucleación de los cristales de HAp puede darse a partir de precipitación directa o mediada por cristales de fosfato octocálcico ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Dichos cristales presentan gran similitud con los de HAp; un hecho que ningún otro tipo de cristal presenta es la misma coordinación 9 para el Ca(1) y siendo que los cristales de fosfato de calcio presentan varias fases sólidas se ha propuesto que a partir de los cristales de fosfato octocálcico se forman en su superficie cristales de HAp (los cuales posteriormente pueden sufrir sustituciones que den origen al carbonato de HAp) mientras los primeros se van disolviendo o hidrolizando en apatita (Brown, 1962).

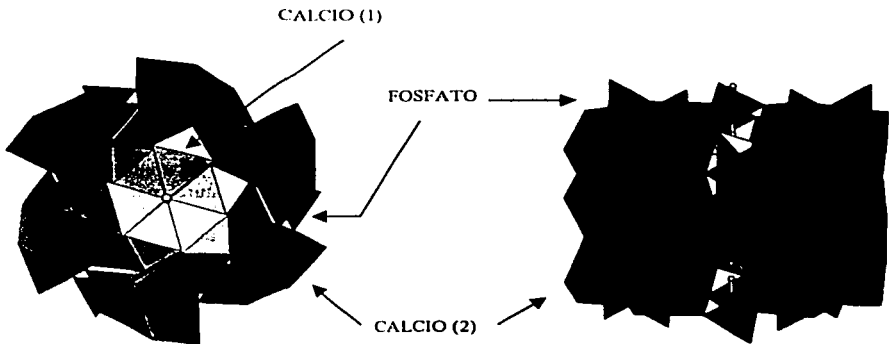


Fig. 4. Modelo de la estructura cristalina de la Hidroxiapatita con sus respectivos poliedros de coordinación.

Así mismo, se ha propuesto que los grupos carbonatos ocupan los lugares de los grupos fosfatos en la HAp con la ayuda de una molécula de agua. Otra posibilidad, no muy clara, es que los grupos carbonatos sustituyan a los OH-. Para ambos casos se ha reportado la obtención sintética de cristales de apatita carbonatada así como su crecimiento a partir de un flujo de CaCO_3 en ausencia de agua y mediante un enfriamiento rápido (Sutsugu, 1999). Otros trabajos mencionan que el crecimiento de los cristales de carbonato de HAp, no presentan un crecimiento preferencial en alguna dirección (LeGeros, 1967).

1.4. Trabajos Previos Realizados en el Laboratorio.

1.4.1. Muestras Óseas Actuales.

Se han realizado en el laboratorio de Metalurgia del Depto. de Estado Sólido del I.F. estudios de tipo morfológico y estructural en huesos de distintas antigüedades y de diferentes clases de vertebrados, principalmente de la apatita biológica, la fase mineral, presente en ellos. Así mismo, se han propuesto modelos para la estructura del carbonato de hidroxiapatita a partir de parámetros reticulares obtenidos experimentalmente (Heredia, 2000). En el mismo trabajo, se ha empleado la técnica de rayos X para estudiar estructuralmente fases cristalinas y hasta cierto punto fases amorfas para implementar una técnica que permita semicuantificar la fase orgánica con respecto a la inorgánica, y obtener una evaluación del método de fechamiento relativo por colágeno residual.

1.4.2. Muestras Óseas Arqueológicas.

Anterior al presente trabajo, Heju Jang había realizado su tesis de maestría evaluando la aplicación de un método de fechamiento por colágeno residual en las muestras arqueológicas que se emplearon en este estudio. Establece un criterio para la selección de muestras que analizó, con el fin de obtener un margen de error mínimo en el cálculo de la tasa de pérdida del colágeno en las muestras óseas y establecer, con esa medida, un método de fechamiento relativo. Los requisitos para seleccionar una muestra eran, la ausencia de patología, que perteneciera a una persona adulta, el tipo de enterramiento, así como, que se tengan las mismas condiciones climáticas, de humedad y temperatura para evitar variaciones que interfirieran en los resultados. Por consiguiente, Heju Jang limitó el muestreo de restos óseos a una sola región climática bien definida, como lo es la Cuenca de México, por tratarse de un área donde se han efectuado estudios climatológicos completos y por haber sido ocupada por el hombre desde una época muy temprana, y además, porque existen en ella un gran número de sitios donde, durante la época prehispánica y colonial, se efectuaron entierros. Lamentablemente, menciona en su tesis, algunos de los restos óseos no cumplen con los requisitos de selección, sin embargo fueron analizados para tener un suficiente número de muestras que resultaran representativas, mientras que otras muestras definitivamente no fueron estudiadas. Esto implicó que obtuviera algunos resultados no esperados, los cuales pueden también estar relacionados específicamente con el origen de los ejemplares.

1.4.3. Muestras Óseas Paleontológicas.

En el laboratorio solamente se han estudiado muestras paleontológicas en el trabajo de Heredia, en específico una muestra de costilla de Sirenia de 15 millones de años. Esta muestra se analizó mediante difracción de rayos X, DRX, microscopía electrónica de barrido, MEB, y calorimetría de barrido diferencial, CBD. Se logró modelar la inclusión del CO_3^{2-} en la estructura de la hidroxiapatita mediante la metodología Rietveld, que ajusta un patrón de difracción calculado con otro experimental. Mediante la microscopía se observó que la muestra presenta una alta mineralización siendo que ha perdido la fase orgánica además del hecho que los Sirenia presentan sus huesos muy mineralizados. Con la calorimetría se obtuvo una curva termooanalítica de muy baja intensidad, pero que aún así muestra la presencia de material orgánico en el hueso.

1.5 Características Generales del Colágeno de Hueso Antiguo.

El tejido óseo, presenta la característica de ser en la gran mayoría de los casos la estructura de origen biológica mejor preservada con respecto al tiempo. Sobre estos restos, se han realizado diversos estudios para conocer su estado de preservación y obtener información con respecto a su antigüedad. Estos estudios van desde aspectos macroestructurales hasta aquellos que implican los cambios químicos, tanto en la fase orgánica como la inorgánica. A este conjunto de cambios se le denomina proceso diagenético, el cual, es resultado de las características propias del hueso al momento de la muerte del organismo junto con las condiciones ambientales (condiciones de enterramiento) a las cuales se encuentra sujeto durante un determinado periodo de tiempo. El proceso diagenético varía de un ambiente a otro y es dependiente de una alta variedad de interacciones, que incluyen factores biológicos, químicos y físicos.

Existen parámetros cuantificables que muestran el estado de preservación del tejido óseo que posibilitan dilucidar bajo qué condiciones ha estado sujeto el hueso y así mismo, establecer su antigüedad relativa. Estos parámetros son principalmente la integridad histológica del tejido, la pérdida de colágeno, el aumento de la cristalinidad y el cambio de la porosidad (Hedges, et al. 1995).

Para entender los cambios que presenta el colágeno en muestras arqueológicas y paleontológicas, es importante tomar en cuenta los factores que participan en mayor proporción en su degradación. Las proteínas presentes en huesos fósiles, consisten usualmente en remanentes o fragmentos de la estructura original, que pueden ser desde péptidos hasta aminoácidos libres. De estas proteínas, la que se encuentra en mayor proporción es el colágeno, habiendo una menor cantidad de proteínas diferentes al colágeno que pueden preservarse, así como proteínas que se mencionan se incorporan al hueso durante el proceso diagenético y no son originarias de dicho tejido (Grupe, 1995). También es necesario mencionar el papel que el cristal tiene en proteger a las moléculas orgánicas del tejido óseo, permitiendo que la degradación de las mismas se vea retardada, de ahí que la disolución de la fase mineral y el aumento de la porosidad del hueso, tienen un efecto negativo sobre la permanencia de las proteínas, principalmente aquellas que presenten mayor solubilidad. Por esta razón, las moléculas orgánicas solubles son difícilmente encontradas en los huesos fósiles.

El factor inicial de la degradación del colágeno es la descomposición que originan distintos organismos presentes en el suelo próximo al tejido, que son capaces de secretar distintas proteasas y peptidasas que atacan específicamente a las proteínas. Esto se debe a que ciertas moléculas como el colágeno, no pueden ser introducidas a través de la membrana de dichos organismos descomponedores, por lo que requieren de exoenzimas para degradar este tipo de polímeros en moléculas de menor tamaño (Childs, 1995). Cuando estas exoenzimas no pueden acceder al tejido óseo debido a la presencia de la fase mineral, se origina un segundo mecanismo de degradación, donde el colágeno se va lentamente hidrolizando hasta que las cadenas son de un tamaño lo suficientemente pequeño para ir saliendo de la estructura del hueso (Collins, et al. 1995). Este segundo mecanismo se lleva a cabo durante largos periodos de tiempo, de miles a millones de años, y es dependiente de la humedad relativa del medio en el cual se encuentra el tejido. Por esta razón, se menciona que la pérdida de colágeno se debe más a la química del suelo circundante al hueso que a la acción de los microorganismos, los cuales, sólo podrían actuar sobre las moléculas superficiales que se encuentran más expuestas.

Durante la diagénesis del hueso, no todos los procesos son deletéreos para las proteínas, puesto que se han descrito algunos tipos de reacciones que introducen entrecruzamientos, en las moléculas del colágeno. La formación de entrecruzamientos no específicos se genera mediante diversos mecanismos químicos (van Klinken, et al. 1995). Una clase es la cual se lleva a cabo con compuestos húmicos exógenos. Los compuestos húmicos son moléculas complejas, predominantemente aromáticas, hidrofílicas, que presentan pesos moleculares de cientos a miles de daltones. Se forman a partir de carbohidratos de origen animal y vegetal, mediante una reacción amino-carbonil de azúcares reducidas con grupos amino libres de diferentes proteínas. Se ha propuesto que los compuestos húmicos, también se pueden generar in situ con el colágeno del tejido óseo de huesos antiguos, aunque no se tiene bien en claro el tipo de entrecruzamiento que se genera entre ambos, por lo que pueden estar presentes interacciones del tipo hidrofóbicas y Van der Waals, así como uniones iónicas y covalentes, pero estas deben de ser iguales de fuertes como las que estabilizan las interacciones entre las triple hélices de colágeno (van Klinken, et al. 1995).

2. ASPECTOS TEÓRICOS DE LOS MÉTODOS EXPERIMENTALES.

2.1. Aspectos Termodinámicos.

La termodinámica permite utilizar métodos generales para el estudio y comprensión de los fenómenos físicos complejos. Los únicos conceptos y magnitudes que intervienen en termodinámica son las propiedades macroscópicas de la materia que se pueden medir experimentalmente, de modo que se pueden conocer y relacionar estas propiedades. Dentro de estas magnitudes se encuentran, entre otras, la presión, P ; el volumen, V ; la temperatura, T ; la energía, E ; las cuales se emplean para especificar el estado de un sistema termodinámico, por lo cual, se denominan como variables o funciones de estado, ya que sus valores dependen solamente del estado del sistema termodinámico. Un aspecto importante de las funciones de estado, es que cuando se altera el estado de un sistema, la variación que experimenta cualquier función de estado depende solamente de los estados inicial y final del sistema.

La primera ley de la termodinámica enuncia que cualquier cambio de la energía interna de un sistema es la suma del calor, Q , comunicado al sistema menos el trabajo, w , realizado por el sistema:

$$\Delta E = Q - w \quad (2.1.1)$$

El hecho de que la energía interna sea una función de estado, tiene una utilidad inmediata en el estudio de procesos químicos. El valor del cambio de energía, ΔE , para una reacción química realizada a temperatura constante es una medida cuantitativa de los valores relativos de las fuerzas de enlace y de las fuerzas intermoleculares de los reactivos y productos. Teniendo en cuenta la ecuación (2.1.1) y utilizando la expresión del trabajo mediante presión y volumen, se puede hallar el valor de ΔE para una reacción química puesto que:

$$dE = dQ - PdV \quad (2.1.2)$$

En condiciones de volumen constante, la variación de la energía interna es igual al calor absorbido por el sistema. En condiciones de presión constante, que es la forma más frecuente en que se realizan las reacciones químicas, la energía interna no es igual al calor absorbido por el sistema. Para poder caracterizar las reacciones químicas a presión constante, se emplea entonces el concepto de entalpía, H , el cual es otra función de estado y se define por la ecuación:

$$H = E + PV \quad (2.1.3)$$

Algunas de las propiedades de la entalpía se pueden deducir hallando su diferencial dH a partir de la ecuación (2.1.3):

$$\begin{aligned} dH &= dE + d(PV) \\ dH &= dE + P dV + V dP \end{aligned} \quad (2.1.4)$$

Siendo que se están considerando procesos bajo presión constante, el término $V dP = 0$, quedando la ecuación de la siguiente forma:

$$dH = dE + P dV \quad (2.1.5)$$

Sustituyendo la ecuación (2.1.2) en la ecuación anterior, se obtiene:

$$dH = dQ - PdV + P dV$$

Y finalmente:

$$dH = dQ \quad (2.1.6)$$

Esto nos lleva al hecho de que la variación de la entalpía es igual al calor absorbido, solamente cuando un proceso se realiza a presión constante. Para cualquier proceso a presión constante en que el sistema desprende calor, el valor de ΔH es un número negativo, lo cual indica que el estado final del sistema tiene una entalpía menor que el estado inicial, y se llama proceso exotérmico. Por otra parte, si un sistema absorbe calor, el valor del ΔH es positivo y el proceso se dice que es endotérmico.

2.2. Calorimetría de Barrido Diferencial.

La calorimetría de barrido diferencial, CBD, es un método que permite la medición directa y precisa de distintos parámetros termodinámicos, como la entalpía, la entropía, la temperatura máxima y la capacidad calorífica, así como la obtención de información respectiva a mecanismos de transiciones dependientes de la temperatura.

Existen dos tipos de calorímetros de barrido diferencial, el de compensación de potencia y el de flujo de energía. El principio de operación de la CBD para el caso de la calorimetría de compensación de potencia es el siguiente: en el instrumento se encuentran dos celdas idénticas, en la primera se sitúa un crisol de aluminio, en el cual, se introduce la muestra bajo investigación, mientras que la segunda celda sirve de referencia, por lo que se coloca un crisol de aluminio vacío. Ambas celdas son calentadas por flujos de calor similares y constantes, si las dos muestras presentan propiedades termodinámicas idénticas, la temperatura dentro de las celdas cambiará idénticamente, lo que da origen a la señal conocida como línea base que en condiciones ideales, a lo largo de todo el intervalo de temperatura del tratamiento, se presentará como una línea recta. Por otro lado, si las dos muestras difieren en dichas propiedades, una diferencia de temperatura entre ambas surgirá. En ese instante, un sistema electrónico cambia el régimen de calentamiento de las celdas de forma que las temperaturas entre estas se igualen. El valor del flujo de calor adicional requerido para esta compensación de temperatura, es transformado mediante un juego de termopares en una señal eléctrica, que es medida por el calorímetro en mW y graficada contra la temperatura para obtener así una curva termoanalítica, que refleja la diferencia de las propiedades entre la muestra bajo investigación y la referencia. Esto significa que existe un cambio de la energía interna de la muestra durante el intervalo de temperatura en que se aprecia dicho proceso.

En el caso de la calorimetría de barrido diferencial mediante flujo de calor, sólo existe una sola celda de calentamiento, en la cual se introducen ambos crisoles. El instrumento tiene instalado un programa de computo, que convierte la diferencia de voltaje obtenida a partir del termopar, que anteriormente había sido amplificadas, en energía por unidad de tiempo, en este caso miliwatts (mW), que es graficada contra la temperatura hasta la cual se realizó el análisis. Esta técnica fue la empleada en el presente trabajo teniendo el instrumento una sensibilidad de $10 \mu\text{W}$.

Existen dos tipos de curvas termoanalíticas, exotérmicas y endotérmicas, ambos procesos se representan como picos en el termograma con una temperatura máxima de la transición que están caracterizando. Así mismo, existen también otras propiedades termodinámicas que no se presentan como picos, estas originan un cambio de la línea base o un cambio de pendiente. Así es posible caracterizar transiciones vítreas y la capacidad calorífica de un compuesto.

El analizador térmico permite obtener distintos parámetros termodinámicos experimentalmente, como la capacidad calorífica y la entalpía. A continuación se presenta una ecuación para obtener la constante de celda del instrumento, a partir de la cual, uno puede obtener una ecuación para la obtención de la entalpía de un compuesto. La ecuación para obtener la constante de celda del Manual de Operación del Calorímetro es la siguiente:

$$E = \frac{\Delta H \cdot m}{60 \cdot A \cdot B \cdot \Delta Q_s} \quad (2.2.1)$$

donde E es la constante de celda, ΔH es la entalpía (J/g), m es la masa de la muestra (mg), A es el área bajo la curva del termograma (cm^2), B corresponde a los valores sobre el eje de las abscisas (min/cm) y ΔQ_s a los valores sobre el eje de las ordenadas (mW/cm). Como se observa, el trabajar con centímetros presupone la utilización de una impresión del termograma sobre la cual realizar las medidas. Para simplificar este procedimiento, se empleó el programa Origin 4.1, mediante el cual se obtiene el área bajo la curva en [mW x °C], pero esto provoca los siguientes cambios en la ecuación (2.2.1).

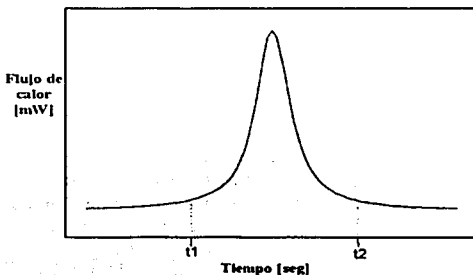


Fig. 5. Gráfica donde se muestra un proceso térmico del calor liberado con respecto a la temperatura.

Como se muestra en la anterior figura 5, se tiene un termograma de determinados valores de q' en función del tiempo "t", donde

$$q' = \frac{\Delta q}{\Delta t} \rightarrow \text{se mide en } [mWatts] \quad (2.2.2)$$

de ahí que la entalpía pueda ser medida a partir de la siguiente integral,

$$\Delta H = \int_1^2 q' dt \quad (2.2.3)$$

Cuando se realiza un análisis de calorimetría de barrido diferencial la muestra se somete a una velocidad de calentamiento específica [v], el cual se especifica en [$^{\circ}C / \text{seg}$],

$$v = \frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{dT}{dt} \quad (2.2.4)$$

del cual se obtiene,

$$dt = \frac{1}{v} dT \quad (2.2.5)$$

sustituyendo (2.2.5) en (2.2.3) se llega a,

$$\Delta H = \frac{1}{v} \int_1^2 q' dT \quad (2.2.6)$$

ahora los límites de integración son $T_1 = T(t_1)$ y $T_2 = T(t_2)$ y lo que se tiene dentro de la integral corresponde a [$mW \times ^{\circ}C$] que es igual al área [a] bajo la curva de la figura 5, dando como resultado,

$$\Delta H = \frac{a}{v} \quad (2.2.7)$$

En el análisis de calorimetría de barrido diferencial la velocidad de calentamiento se da en unidades de [$^{\circ}C / \text{min}$] y en la ecuación (2.2.4) el Δt se da en [seg] por lo cual resulta necesario introducir en la ecuación (2.2.7) un valor de 60 para obtener así [min] como es utilizado en el instrumento. Además se debe introducir la constante de celda "E" que esta relacionada con la obtención del ΔH como se muestra en la ecuación (2.2.1), con lo cual se obtiene,

$$\Delta H = 60 \frac{a}{v} E \quad (2.2.8)$$

por último, la entalpía que hasta ahora se ha manejado debe ser expresada en función de la masa [m] de la muestra utilizada en la medición, para tener un valor significativo del ΔH y que pueda ser comparado con otras muestras. Siendo esto cierto, tenemos que,

$$\Delta H' = \frac{\Delta H}{m} = 60 \frac{a}{mv} E \quad (2.2.9)$$

donde $\Delta H'$ es justamente el valor entalpía por unidad de masa de la muestra. Las unidades de esta $\Delta H'$ son las siguientes,

$$\frac{[mW \cdot ^\circ C]}{[mg] \cdot [^\circ C \cdot min]} = \frac{J}{g}$$

Finalmente, se tiene la ecuación (2.2.9) en la cual, se utilizan los datos obtenidos del área directamente a partir de la integración de la curva hecha mediante el programa Origin 4.1, junto con la masa y la velocidad de calentamiento empleados en el experimento.

2.3. Análisis Térmico Gravimétrico

El análisis térmico gravimétrico es el estudio de los cambios de peso de una muestra en función de la temperatura o el tiempo, en presencia de una variedad de atmósferas controladas. La técnica es útil en situaciones donde se dan transformaciones que conllevan la absorción o liberación de gases de una muestra que consiste de una fase condensada. La muestra se sitúa en una charola de platino que se encuentra en el horno y está suspendida de una balanza de alta precisión, el horno posee una resistencia de baja masa térmica que puede ser enfriada o calentada rápidamente. Un termopar se encuentra cercano a la charola sin entrar en contacto con ella para llevar el registro de la temperatura dentro del horno. La balanza está compensada electrónicamente de modo que la cazuela no se mueva cuando la muestra gana o pierda peso.

La muestra se somete a una velocidad de calentamiento en un intervalo de temperatura que puede ir desde temperatura ambiente hasta 1000°C. En el analizador se emplea un flujo de gas, el cual mantiene a la muestra en una atmósfera inerte, reductora u oxidante según sea el caso, que arrastra los productos volátiles de las distintas reacciones que presente la muestra debido al tratamiento térmico. El flujo del gas es casi laminar, por lo que no afecta las mediciones al provocar movimiento de la charola. El flujo de gas, bajo y constante también sirve para evitar que los productos reaccionen o se impregnen en las paredes del ATG.

2.4. Espectroscopía Infrarroja

La radiación infrarroja, es una radiación electromagnética situada entre la región visible (más allá de la parte roja) y la región de microondas, formada por un campo eléctrico y un campo magnético oscilantes con la misma frecuencia y perpendicular a la dirección de propagación de la radiación. Se caracteriza por una frecuencia de oscilación y una longitud de onda, relacionadas a través de la fórmula

$$c = v\lambda$$

donde c es la velocidad de la luz en el medio (en m/seg), v es la frecuencia (en Hz) y λ es la longitud de onda (en m). El llamado número de onda se define como $K = 2\pi/\lambda$ y se expresa en cm^{-1} . El uso de número de onda es utilizado muy frecuentemente en espectroscopía infrarroja. En el intervalo de $10000\text{-}100\text{ cm}^{-1}$ la radiación infrarroja es absorbida típicamente por las moléculas orgánicas y convertida en energía de vibración molecular. El número de onda de una línea del espectro es directamente proporcional a la variación de energía existente de los niveles energéticos de los diferentes estados en que pueden existir los átomos o moléculas; por esto, en espectroscopía suele considerarse el cm^{-1} como una unidad de energía.

La región del infrarrojo se divide en tres regiones conocidas como el próximo o cercano, el medio o fundamental y el lejano que abarcan a los número de onda desde $13,333\text{ cm}^{-1}$ hasta 10 cm^{-1} . El infrarrojo medio comprende entre $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ y en esta región aparecen las bandas de absorción debidas a las vibraciones fundamentales de las moléculas (estiramiento, flexión y balanceo) por lo que es la más importante y más empleada en espectroscopía infrarroja.

La espectroscopía infrarroja, se basa en las reglas de selección cuánticas y en el hecho de que la oscilación o vibración que presentan los átomos que conforman una molécula, tiene una frecuencia de la misma magnitud que la de la radiación infrarroja por lo que se da una absorción de la energía de la radiación por parte de las moléculas. El espectro infrarrojo es el registro del porcentaje de la radiación absorbida por una sustancia en función del número de onda de la radiación infrarroja incidente. El espectro de absorción, se obtiene por la irradiación con luz infrarroja de sucesivas frecuencias y por la medida simultánea de la intensidad de la radiación transmitida. Un espectrógrafo consta de tres partes fundamentales. La fuente emisora de radiación infrarroja continua, el sistema dispersivo que se encarga de separar la radiación según su longitud de onda y proporciona haces a frecuencias conocidas, y un detector que mide la intensidad de cada uno de estos haces de radiación infrarroja para ser posteriormente transformados en una señal eléctrica que nos da finalmente el espectro.

Anteriormente se ha empleado el FTIR para la determinación de la estructura de proteínas. Las primeras aplicaciones fueron en la determinación cuantitativa de estructuras secundarias por lo que este método ofrece información aplicable al análisis de la estabilidad de proteínas. Los estudios realizados se enfocan principalmente al análisis del enlace peptídico siendo la región de la Amida I entre 1600 y 1700 cm^{-1} la más empleada. La absorción de luz infrarroja por los enlaces peptídicos en esta región surge en primera instancia por las vibraciones de estiramiento del C=O y en segundo de contribuciones menores del estiramiento de C-N y deformación del C-C-N . La región de la Amida II ($1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) es empleada de forma ocasional para los análisis conformacionales y está representada principalmente por señales del doblamiento del N-H y en menor proporción por el estiramiento de C-N . Las bandas de Amida de mayor y menor frecuencia (Amida A, Amida B y Amida III-VII) son de menor intensidad o están menos caracterizadas por lo que no son tan frecuentemente utilizadas.

En la tabla 1, se muestran las asignaciones de la región de la Amida I aceptadas hoy en día para las respectivas bandas de absorción de varias estructuras secundarias. En algunos casos, no se tiene la completa seguridad de la asignación debido a la falta de un mayor número de análisis en diferentes proteínas, además de que se deben de considerar las contribuciones de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, aún así se menciona que se han empleado estas asignaciones para el caso de la Amida I con buenos resultados (Middaugh, et al. 1995). El empleo de las asignaciones de la región de la Amida II ha resultado más difícil ya que las alfa hélices (1550 y 1520 cm^{-1}) y las hojas beta (1530 y 1560 cm^{-1}) producen bandas en números de onda cercanos, además las estructuras al azar de la proteína también aparecen en esta región, por lo común entre 1536-1550 cm^{-1} .

Tabla 1. Asignación de las bandas de absorción de la región de la Amida I para diferentes estructuras secundarias.

ESTRUCTURA SECUNDARIA	NÚMERO DE ONDA (cm^{-1})
α Hélices	1650-1658 1630-1640 (posiblemente)
Hélices 3_{10}	~1640 (posiblemente)
Hélices izquierdas	1660-1670 (poli- β -benzil-aspartato)
Hélices Poli(L-Pro)	~1630 1630,1644,1660 (colágena)
Hoja β	1670-1680 1620-1640 (varios componentes)
Vueltas	1680-1700 (varios componentes)
Giros y Regiones desordenadas	1645-1655 (¿varios componentes?)

2.5. Cromatografía de Gases

La cromatografía, es un método que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. La muestra se disuelve en una fase móvil, la cual se hace pasar por una fase estacionaria inmisible que se mantiene fija. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. En la cromatografía de gases específicamente, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas de la muestra analizada, su única función es la de transportar la muestra a través de la columna.

La cromatografía de gas-sólido, se basa en la adsorción de sustancias gaseosas sobre superficies sólidas y es aplicable principalmente para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular tales como el sulfuro de hidrógeno, óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono, dióxido de carbono y los gases nobles. Esta cromatografía se puede

llevar acabo en columnas de relleno que se fabrican con tubos de vidrio, metal (acero inoxidable, cobre, aluminio), o de teflón con una longitud característica de 2 a 3 m y un diámetro interno de 2 a 4 mm. Estos tubos se empaquetan densamente con un material de relleno sólido, finamente dividido y homogéneo que consiste en bolas de polímeros porosos de tamaño uniforme que se fabrican a partir de estireno polimerizado con divilbenceno. El tamaño de poro en estas bolas es uniforme y se controla por el grado de polimerización. Los polímeros porosos han encontrado una gran aplicación en la separación de especies polares gaseosas.

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. Manejo del Material Óseo para su Análisis.

Las muestras de hueso actuales y de origen arqueológico y paleontológico fueron limpiadas de las impurezas externas, ya sea polvo, arena, tierra, restos de detritus, etc., que pudieran traer cuando son adquiridas por el laboratorio. En los casos de huesos actuales, es necesario aplicar un disolvente orgánico (alcohol etílico) para extraer los fragmentos de tejidos adyacentes. Posteriormente, son pulverizadas en un molino utilizando un mortero de ágata y tamizadas mediante una malla del 325 para obtener partículas de un tamaño homogéneo, alrededor de 40 micrómetros.

En algunos casos no se utilizaron muestras de hueso molidas, solamente se obtuvo un fragmento de hueso de un peso aproximado a los 10 mg, sobre el cual se realizaron las pruebas, principalmente calorimetría de barrido diferencial. Esto es debido a que en las muestras óseas de mucha antigüedad, la presencia de colágeno es mínima y se encuentra bastante degradado, y durante el proceso de pulverización se puede ocasionar la fragmentación de las moléculas de la proteína y así se reducen al punto de presentarse una señal muy pobre en el termograma que dificulta su análisis. Se ha mencionado en la literatura que al moler el hueso, el colágeno se puede ver afectado de cierta forma (ver apéndice III) por la fricción de las bolas de ágata, dando origen a una modificación y posible pérdida parcial (Nielsen, et al. 2000). Por esta razón, el empleo de fragmentos asegura que el colágeno residual, por mínimo que sea, permanezca en la estructura ósea y esto permite al equipo registrar cualquier diferencia térmica entre la muestra y la referencia que indique la degradación de la proteína. Este fue el caso de las muestras de origen paleontológico, que al ser de millones de años de antigüedad, presentaron muy poca materia orgánica. Por otro lado se tuvo el cuidado de utilizar, en todas las mediciones, trozos de la misma masa para evitar que la señal presentara un comportamiento distinto (ver apéndice I). Cabe mencionar que el analizador térmico, presenta una sensibilidad bastante alta como para detectar fracciones muy pequeñas de compuestos que tengan algún tipo de respuesta térmica en el intervalo de temperatura que se trabaje.

El material óseo, se puede tratar de distintas formas dependiendo del tipo de análisis al cual va a ser sometido para obtener resultados que reflejen las características del mismo y que no favorezcan la aparición de distintos tipos de señales cada vez que se analice una misma muestra, es decir, para obtener resultados reproducibles e interpretables. En el caso de la calorimetría de barrido diferencial (CBD) es preferible que la muestra tenga un contacto superficial amplio con el crisol de aluminio, por lo que la mejor forma de asegurar esto es trabajando con la muestra en polvo, de modo que se distribuya homogéneamente sobre toda la superficie del crisol. De trabajar con la muestra en forma de trozo, se sugiere que ésta tenga la mayor superficie de contacto y debe de presentar una alta difusión de calor a través de su estructura para que el termograma represente de mejor forma el proceso que se esté analizando. El crisol de aluminio se puede utilizar en el módulo con o sin tapa de aluminio. Experimentalmente se encontró que en ciertos casos al estar tapado, el gas producto de la degradación y combustión de la proteína, genera una presión de vapor que provoca que exista ruido en la señal. Debido a lo anterior las muestras óseas, de HA y de colágeno se analizaron sin tapa.

Para el caso del Análisis Térmico Gravimétrico, la Espectroscopia Infrarroja y la Cromatografía de Gases, se utilizaron en todos los experimentos muestras óseas pulverizadas y tamizadas que presentaban el mismo tipo de tratamiento previo al análisis.

3.2. Muestras Óseas y de Colágeno Tipo I.

En el estudio, se emplearon muestras óseas de distintas características que se dividen en tres grupos:

- a) Huesos humanos modernos, esto significa que no tienen más de 30 años de antigüedad y provienen de individuos que no presentaban enfermedad ósea alguna.
- b) Huesos humanos de interés arqueológico. Son muestras provenientes de 7 sitios diferentes de la cuenca del Valle de México que van de los 185 +/- 25 años hasta los 3150 +/- 150 años aproximadamente y constan de fémures y húmeros.
- c) Huesos de distintos vertebrados de interés paleontológico. Son principalmente muestras que presentan entre 1 y 73 millones de años, aunque también se estudiaron muestras entre 10 y 15 mil años. Las muestras consisten en diferentes huesos como vértebras, costillas, mandíbulas, cráneos, etc.

Las muestras de huesos humanos modernos estudiadas fueron un cráneo y un radio, el radio corresponde a un adulto que falleció hace 30 años, mientras el cráneo es de un joven de 16 años fallecido a principios del año 2001. Estas muestras, se trataron buscando retirar todo el tejido conjuntivo que rodea al tejido óseo mediante el uso de alcohol etílico, para evitar que esto pudiera afectar los resultados.

En el caso de las muestras arqueológicas, estas fueron previamente en el Instituto de Investigaciones Antropológicas de la UNAM, quien seleccionó las muestras de acuerdo a determinados criterios (Heju Jang, 2000), como a) la ausencia de patologías óseas; b) que las muestras pertenezcan a un adulto que haya completado la formación del crecimiento longitudinal del hueso; c) limitar el muestreo a una región climática bien definida para evitar variables como diferentes intervalos de temperatura y humedad, y d) que las muestras sean todas preferentemente de huesos largos como húmeros y fémures. Estas muestras habían sido limpiadas previamente por Heju Jang por lo que se encontraban en perfectas condiciones para su análisis y corresponden a las siguientes localidades:

- a) Cuicuilco: pertenece al Preclásico Tardío (hace 2250 ± 350 años). Se encuentra al sur de la Ciudad de México, junto a Villa Olímpica.
- b) Oztoyohualco: pertenece al Clásico Tardío (hace 1450 ± 100 años). Se encuentra ubicado en el margen noroeste de la ciudad de Teotihuacan.
- c) Tlalocan: pertenece al Clásico Tardío (hace 1300 ± 100 años). Son un conjunto de cuevas que se encuentran al oriente de la Pirámide del Sol, que al parecer servían de cementerio o un sitio donde se realizaban actividades rituales.
- d) Xochimilco: pertenece del Preclásico Tardío hasta el Posclásico Tardío (desde 614.5 ± 135.5 hasta 2250 ± 350 años). Se encuentra en el área central del Foro Cultural Quetzalcoatl, en el Centro Histórico de Xochimilco.

- e) Tlatelolco: pertenece al Posclásico Tardío (hace 614.5 ± 135.5 años). Se ubica entre el Eje Central Lázaro Cárdenas y Manuel González, junto a la iglesia de Santiago Tlatelolco, en la zona denominada "Plaza de las Tres Culturas".
- f) Ex convento de San Jerónimo: fechado entre 1626 y 1850 (hace 274.5 ± 99.5 años). Se encuentra en el Centro Histórico de la Ciudad de México en la cuadra limitada por las calles de San Jerónimo, 5 de febrero, Izazaga e Isabel La Católica, también es llamado Claustro de Sor Juana.
- g) Templo de San Pedro y San Pablo: fechado entre 1790 y 1840 (hace 185 ± 25 años). Se encuentra en el perímetro "A" de la zona del Centro Histórico de la Ciudad de México, en la esquina de la calle San Ildefonso, 3^a del Carmen y 2^a de Venezuela.
- h) Xcambo y Bonampak: muestras no analizadas por Jang Cho provenientes de los respectivos sitios arqueológicos, su antigüedad se calcula alrededor de 1350 ± 150 años.

Las muestras paleontológicas, fueron suministrados por el Doctor Francisco Aranda Manteca de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California y consistieron en fragmentos de distintos huesos. En la mayoría de los casos los huesos se encontraban limpios y en otros se les retiró las impurezas que presentaban, ya fuera arena o tierra proveniente del estrato del cual fueron recolectados. Los ejemplares corresponden a diferentes formaciones geológicas dependiendo de su antigüedad:

- a) Cretácico Tardío (73 millones de años): estos ejemplares fueron colectados en la formación El Gallo, en la localidad ubicada al oeste del poblado del Rosario, Baja California. Los sedimentos muestran una alternancia de areniscas gruesas amarillentas, alternadas con lutitas color gris oscuro. Los sedimentos representan un ambiente deltaico, muy cercano a la línea de costa, las areniscas representan el aporte pluvial y las lutitas indican la depositación normal de baja energía.
- b) Mioceno Medio (15 millones de años): los ejemplares corresponden a la formación Rosarito Beach, Miembro Los Indios, localidad Mesa La Misión, ubicada entre Tijuana y Ensenada, Baja California. Dicha formación, marca una secuencia sedimentaria que corresponde a un ambiente marino de baja energía, como una plataforma continental. Los sedimentos están constituidos de areniscas medias a muy finas de color gris claro a café amarillento. Los sedimentos de color gris claro son de origen volcánico piroclástico, mientras que los de color café amarillento tienen un origen terrígeno, siendo estos últimos menos abundantes. Estos materiales permanecieron en un ambiente marino costero y posteriormente fueron depositados en aguas más profundas.
- c) Mioceno Tardío (9 millones de años): estos ejemplares fueron colectados en la formación Almejas Inferior, en la localidad al sur del poblado de Cedros en Isla de Cedros, B.C., formada por una secuencia de sedimentos que varían desde grano grueso (conglomerados) hasta areniscas muy finas de color rojizo y gris claro. El ambiente de depositación se asocia con una zona de mar profundo, tal vez cercana a una o varias islas.
- d) Pleistoceno (1 millón de años): estos restos fueron encontrados en los sedimentos de una secuencia sedimentaria no descrita, posiblemente asociada a la formación Rosarito Beach, Miembro Los Buenos, que afloran en la localidad conocida como

Los Buenos, al sur de la ciudad de Tijuana, Baja California caracterizada por areniscas y conglomerados, de tipo fluvial.

Además de las muestras óseas, se requirió analizar otros compuestos que sirvieran para comparar y/o interpretar los resultados, como es el caso del colágeno extraído del tendón de Aquiles de bovino, fosfato de calcio tribásico, ambos de Sigma-Aldrich Chemie y colágeno extraído de hueso actual mediante dos métodos. Un método de extracción, que se aplicó en el hueso de Granada, consistió en hervir trozos de hueso en agua durante una hora, para posteriormente decantar y desecar para separar la fase mineral de la orgánica. Es importante señalar que esta metodología conlleva un tratamiento térmico sobre el colágeno. Posteriormente se discutirá su efecto sobre los análisis térmicos que se realizaron en esta muestra. El segundo método de extracción, consistió en desmineralizar trozos de huesos de 2 x 2 x 2 mm de la muestra de México mediante el uso de EDTA 0.1 M a un pH de 7.4, durante 2 días, cambiando la solución cada 24 horas.

A continuación se muestra la tabla con las características de todas las muestras analizadas:

Tabla 2. Muestras analizadas. En cada caso se mencionan las características, tipo de muestra, edad, origen, método de extracción.

Compuestos:

MUESTRA	NUMERO DE PRODUCTO	COMPAÑIA
Colágena Tipo 1	C-9879	SIGMA-ALDRICH
Fosfato de Calcio	C-5267	SIGMA-ALDRICH

Muestras de Colágeno Extraídos de Huesos Actuales:

MUESTRA	ORIGEN	MÉTODO
Colágeno	Muestra Granada	Tratamiento térmico
Colágeno	Muestra México	Tratamiento con EDTA

Muestras Humanas Actuales:

MUESTRA	HUESO	EDAD (años)
Granada	Radio	Adulto
México	Cráneo	Joven 16 años

Muestras Arqueológicas:

MUESTRA	HUESO	EDAD (años)
Tlatilco Ent. 27	Fémur	3150 +/- 150
Tlatilco Ent. 197	Fémur	3150 +/- 150
Cuicuilco A.	Fémur	2250 +/- 350
Cuicuilco I.	Fémur	2250 +/- 350
Oztoyohualco Ent. 14	Fémur	1450 +/- 100
Xcampo		1350 +/- 150
Bonampak		1350 +/- 150
Tlalocan Ent. 2	Fémur	1300 +/- 100
Tlalocan Ent. 15	Fémur	1300 +/- 100
Xochimilco Ent. 17	Fémur	1250 +/- 150
Xochimilco Ent. 1	Fémur	825 +/- 75
Xochimilco Ent. 9	Fémur	614.5 +/- 135.5
Xochimilco Ent. 13-B	Fémur	614.5 +/- 135.5
Xochimilco Ent. 15	Fémur	614.5 +/- 135.5
Tlatelolco C6 T8	Húmero	614.5 +/- 135.5
Xochimilco Ent. 14-A	Fémur	614.5 +/- 135.5
San Jerónimo 1	Fémur	274.5 +/- 99.5
San Jerónimo 3	Fémur	274.5 +/- 99.5
San Jerónimo 4	Fémur	274.5 +/- 99.5
San Pedro San Pablo U1 Ent. 1	Fémur	185 +/- 25
San Pedro San Pablo U7 Ent. 5	Fémur	185 +/- 25
San Pedro San Pablo U7 Ent. 16	Fémur	185 +/- 25
San Pedro San Pablo U7 Ent. 18	Fémur	185 +/- 25

Muestras Paleontológicas:

MUESTRA	HUESO	EDAD (años)
Hadrosaurio (<i>Hadrosaurus sp.</i>)	Costilla	73,000,000
Quelonceo	Placa lateral	15,000,000
Atún (<i>Thunnus sp.</i>)	Vértebra	15,000,000
Cetáceo Odontoceti	Disco intervertebral	15,000,000
Cetáceo Mysticeti	Cráneo	15,000,000
Raya (<i>Raja sp.</i>)	Mandíbula	15,000,000
Cetáceo Mysticeti	Mandíbula	15,000,000
Sirenio (<i>Trichechus sp.</i>)	Costilla	15,000,000
Tiburón (<i>Squatina sp.</i>)	Vértebra	9,000,000
Delfín	Tórax	9,000,000
Otárido (<i>Thalassoleon mexicanus</i>)	Disco intervertebral	9,000,000
Pinipedo	Costilla	9,000,000
Mastodonte (<i>Gomphotherium sp.</i>)	Vértebra	1,000,000
Mamut 1 (<i>Mammuthus sp.</i>)		10,000
Mamut 2 (<i>Mammuthus sp.</i>)		10,000
Mamut 3 (<i>Mammuthus sp.</i>)		10,000
Mamut 4 (<i>Mammuthus sp.</i>)		10,000

En el caso de las muestras paleontológicas se tiene información del contenido inorgánico de cada uno de los huesos analizados. El conocer el contenido inorgánico es de importancia debido a la relación que guarda en distintas proporciones con la materia orgánica. Se presentan además de la hidroxiapatita, el cuarzo, la anortita y la calcita, como se muestra a continuación.

Presencia de distintos minerales (en proporción) en las muestras paleontológicas:

MUESTRA	Hidroxiapatita	Cuarzo	Anortita	Calcita
Hadrosaurio	33 %			67 %
Quelonco	74 %	26 %		
Atún	53 %	23 %	24 %	
Cetáceo Odontoceti	100 %			
Cetáceo Mysticeti	100 %			
Raya	100 %			
Cetáceo Mysticeti	100 %			
Sirenio	100 %			
Tiburón	100 %			
Delfín	58 %	22 %	20 %	
Thalassolcon m.	100 %			
Pinípodo	6 %	54 %	40 %	
Mastodonte	40 %	40 %	20 %	

3.3. Calorimetría de Barrido Diferencial.

La calorimetría se realizó en el equipo Thermal Analysis System 9900, Du Pont 910 Módulo DSC. Las muestras de hueso se colocan en un crisol de aluminio, en el analizador térmico se introducen las muestras de interés así como la referencia. Los miligramos empleados durante los análisis variaron de acuerdo a la muestra. Para el caso de los huesos actuales y arqueológicos consistió de 2.0 mg de hueso en polvo, para las muestras de colágeno fue de 1.0 mg, mientras que para las muestras paleontológicas, como se menciono anteriormente, se emplearon trozos de hueso de aproximadamente 10 mg. En la mayoría de los casos, se utilizó una velocidad de calentamiento de 10°C / min., desde temperatura ambiente hasta 600 °C, temperatura máxima que el diseño del módulo permite alcanzar. En otros casos, se cambio la velocidad de calentamiento para evaluar su efecto en la forma de la curva del termograma, dichos casos se especifican en los resultados.

También, se empleó la ecuación No. 9 para obtener el ΔH de las muestras actuales y paleontológicas, así mismo se repitió cada análisis 3 veces para comprobar su reproducibilidad y obtener la desviación estándar.

3.4. Análisis Térmico Gravimétrico.

Los análisis térmico gravimétricos se realizaron en un Módulo TGA, Thermal Analysis System 9900, Du Pont 951. La muestra de hueso en polvo, se introduce en una charola de platino que funciona como platina del analizador térmico gravimétrico. En todos los casos se utilizaron 20 mg. de muestra. La velocidad de calentamiento fueron de 10 °C / min. hasta los 600 °C y 900 °C. Las muestras de huesos actuales y el colágeno se corrieron hasta 900 °C, mientras que las muestras arqueológicas se analizaron hasta 600 °C.

3.5. Espectroscopía Infrarroja.

Los análisis de espectroscopía infrarroja se realizaron en un equipo Nicolet 680. Para la realización de los análisis se fabricó una pastilla sobre la cual incide el haz del laser de infrarrojo. La muestra de tejido óseo previamente molida, se mezcla con KBr en una proporción de 1:100, lo cual, resulta más que suficiente para la obtención del espectro. Se requiere que tanto el KBr como la muestra estén finamente molidas para que la pastilla se obtenga lo más homogénea posible y delgada de tal manera que el haz pueda atravesarla y alcanzar el detector. Los análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) que se llevaron acabo se dividen en dos tipos:

- a) Aquellos donde se le aplicó a la pastilla un tratamiento térmico.
- b) Aquellos en los cuales la pastilla (y por ende la muestra ósea) no tuvo tratamiento alguno.

El tratamiento térmico consistió en introducir la pastilla a una mufla a distintos valores de temperatura (200, 300, 400, 500 y 600 °C) manteniéndola durante 5 minutos en dichas temperaturas, para inmediatamente ser introducida al instrumento de medición obteniendo el espectro infrarrojo correspondiente. A diferencia de las demás técnicas de análisis, no se determinó una velocidad de calentamiento al no poder controlar finamente la rampa de calentamiento de la mufla, de ahí que se decidiera mantener la pastilla en un isoterma en cada temperatura asignada.

3.6. Cromatografía de Gases.

La cromatografía de gases se realizó en un equipo Tometrics Instrument. Para esto se empleó una cantidad de 500 mg de hueso pulverizado, con lo cual se asegura que a partir de la reacción de combustión, se obtienen cantidades suficientes de gases desprendidos para que la columna pueda detectarlos. Sólo se analizó la muestra de D.F. con la cual, se realizaron 3 diferentes cromatografías. En todos los casos, se aplicó un tratamiento térmico a la muestra que consistía en programar una velocidad de calentamiento e isotermas; en el momento en que se alcanzaba cada isoterma, se realizaba una medida. Los intervalos de temperatura variaron con respecto a cada cromatografía. La atmósfera empleada en todas las cromatografías fue de O₂ al 100% con un flujo de 10 ml por minuto y He al 100% con flujo de 40 ml. por minuto, lo que origina una proporción final de O₂ de 20% y de He de 80%. Se escogió esta relación, debido a la necesidad de tener una concentración de O₂ semejante a la de la atmósfera terrestre pero, sin la presencia de nitrógeno y otros gases que pudieran afectar las mediciones (ver apéndice IV). La presencia de He como gas inerte no

tiene ningún efecto sobre la combustión de la proteína. En cada medición, se obtienen las unidades de área de los picos de gases retenidos para cada columna, los cuales sirven para comparar de forma cuantitativa los diferentes gases que se retienen en cada inyección.

La columna Carboxen 1000 es capaz de detectar la presencia de O_2 , H_2O y N_2O , mientras que también detecta pero no distingue entre CO_2 y NO_2 , y entre CO y NO . En este caso se tomaron medidas cada $50^\circ C$ desde $250^\circ C$ hasta $700^\circ C$. La columna Porapak N Porous Polymers detecta N_2 , NO , CO_2 , O_2 y N_2O y es incapaz de detectar NO_2 , las respectivas medidas fueron cada $50^\circ C$ desde $250^\circ C$ a $500^\circ C$ y cada $100^\circ C$ desde $500^\circ C$ hasta $800^\circ C$. La columna Sieve 5s detecta O_2 , N_2 , CO y NO y no detecta H_2O , CO_2 , NO_2 y N_2O , las medidas fueron cada $50^\circ C$ desde $250^\circ C$ hasta $500^\circ C$.

4. RESULTADOS.

4.1. Muestras Óseas Actuales

4.1.1. Calorimetría de Barrido Diferencial (CBD)

En las muestras óseas de Granada y México (ver tabla 3), los termogramas presentan un pico endotérmico entre 40 y 120 °C que corresponde a la salida del agua fisiabsorbida ó agua superficial, de la muestra. Posteriormente se presenta un pico exotérmico con una T_{max} a ~350 °C con un hombro a ~440 °C (Fig. 6a y 6b), este proceso exotérmico inicia a los ~230 °C y finaliza completamente a los 550 °C y corresponde a la degradación y combustión del colágeno. Una característica de los procesos térmicos estudiados en este calorímetro, es que una vez concluidos, la línea base regresa al valor en el cual se dio inicio el proceso, a excepción de aquellos procesos que conllevan un cambio de fase de la muestra como puede ser una transición vítrea. En el caso de la combustión, es de esperarse que se restablezca la línea base al terminar la degradación y combustión a un valor de flujo de calor cercano al inicial, como se observa en las figura (6a) y (6b), esto facilita la obtención del área bajo la curva.

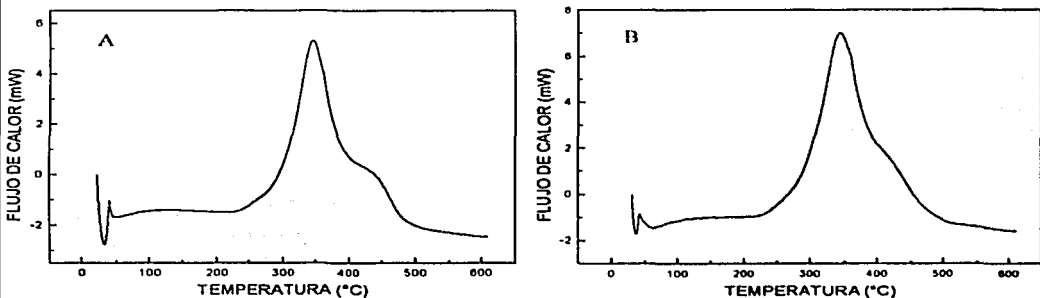


Fig.6. Termogramas de muestras óseas actuales, A) Granada y B) México. En todos los casos los picos endotérmicos se muestran hacia arriba y los picos exotérmicos hacia abajo.

El valor de T_{max} se emplea para caracterizar la estabilidad térmica del material analizado en el calorímetro, y corresponde al valor máximo de intensidad de flujo de calor de todo el proceso exotérmico. A partir del área bajo la curva de los picos exotérmicos, se obtuvo el valor de la entalpía de la combustión del colágeno de cada muestra utilizando la ecuación 2.2.9 como se observa en la tabla 3. Para obtener el área bajo la curva, se utilizó el programa Origin 4.1 ajustando previamente una línea base. Los valores de ΔH resultan muy semejantes y reproducibles, siendo que ambos huesos son recientes y presentan las mismas condiciones de tratamiento.

Tabla 3. Valores de entalpía para las muestras óseas actuales.

Muestra	No. de medidas	ΔH (kJ/g) Promedio
México (radio)	3	-8.39 \pm 0.15
Granada (cráneo)	3	-8.42 \pm 0.11

4.1.2. Análisis Térmico Gravimétrico.

En las figuras (9a) y (9b), se muestran las curvas termogravimétricas de las dos muestras óseas actuales, en ellas se observa una primera pérdida de masa entre temperatura ambiente y 200 °C, que corresponde al agua superficial y equivale aproximadamente al 9% de la masa total. Entre los 200 °C y hasta los 550 °C hay una segunda pérdida de masa de 23.80% y 28.62% del hueso Granada y México respectivamente que corresponde al proceso de combustión, que es el mismo intervalo de temperatura que se observa en los picos exotérmicos de los termogramas de la calorimetría.

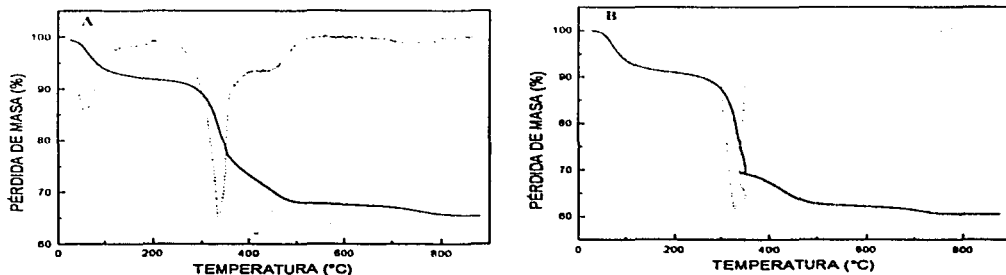


Fig. 9. Curvas termogravimétricas de las muestras óseas A) Granada y B) México. Las líneas punteadas muestran la primera derivada de cada una de las curvas.

Finalmente, entre 600 a 800 °C aparece una tercera pérdida de masa, que podría asociarse a los carbonatos presentes en la estructura de la hidroxiapatita que sustituyen a los grupos fosfato, siendo el 2.03% para la muestra de Granada y 2.22% de la muestra del México. En la figura 10, se relaciona esta pérdida de carbonatos en la hidroxiapatita con el de la curva termogravimétrica del Oxalato de Calcio monohidratado, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. La razón de esta comparación, proviene de la hipótesis de que la hidroxiapatita se descarbonata a alta temperatura. Así, si se compara el ATG del $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ donde la pérdida de A a B corresponde a la deshidratación del Oxalato, posteriormente de 400 a 550 °C se da una descarbonilación (perdiendo CO) dando origen al (C) Carbonato de calcio, CaCO_3 . Por último, de 620 a 780 °C se da una descarboxilación (perdiendo CO_2) originando (D) Óxido

de Calcio, CaO, dándose este último proceso en el mismo intervalo de temperatura que la descarboxilación del carbonato de hidroxapatita en el hueso.

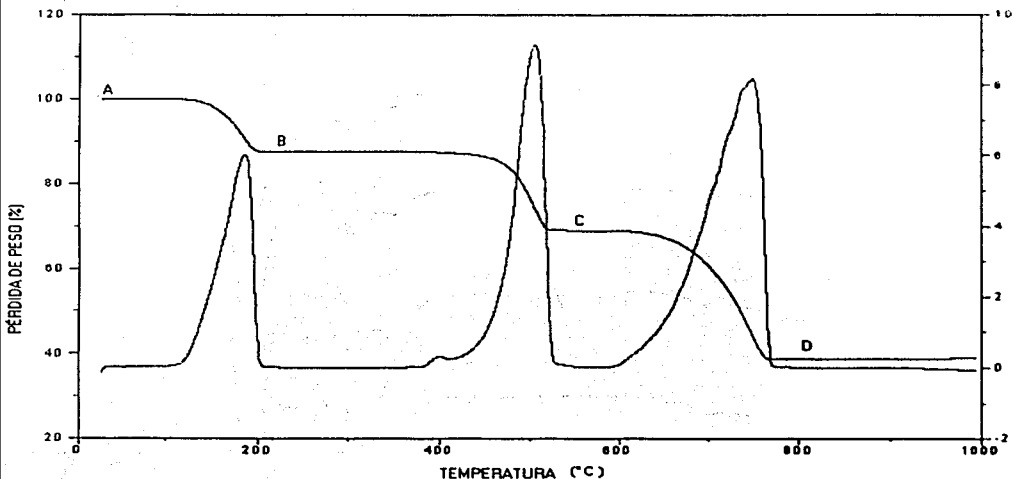


Fig. 10. Curva termogravimétrica del Oxalato de Calcio.

Respecto a los termogramas de las muestras de huesos actuales, la masa restante de las figuras (9a) y (9b) corresponde a la hidroxapatita del hueso (sin sustituciones de carbonatos) que es, de alrededor de 60 y 65% del total de la masa. El porcentaje de colágeno de cada muestra, se emplea en la ecuación 2.2.9 para normalizar el valor de la masa y así obtener el valor correcto de entalpía debida a la degradación y combustión del colágeno. En las mismas figuras se observa la primer derivada de la pérdida de masa, la cual, tiene mucha semejanza con la curva de la CBD, de ésta se obtienen los valores de temperaturas exactos en que inicia y termina cada uno de los procesos.

4.1.3. Espectroscopia Infrarroja.

En la figura 11 se muestra el espectro IR de la muestra de México, aquí se encuentran juntas las bandas del colágeno y de la hidroxapatita. Para su mejor comparación, se muestran los espectros por separado a las diferentes temperaturas a las que se obtuvo la muestra, mientras que en la tabla 4 se muestran las asignaciones de las respectivas bandas de los grupos funcionales.

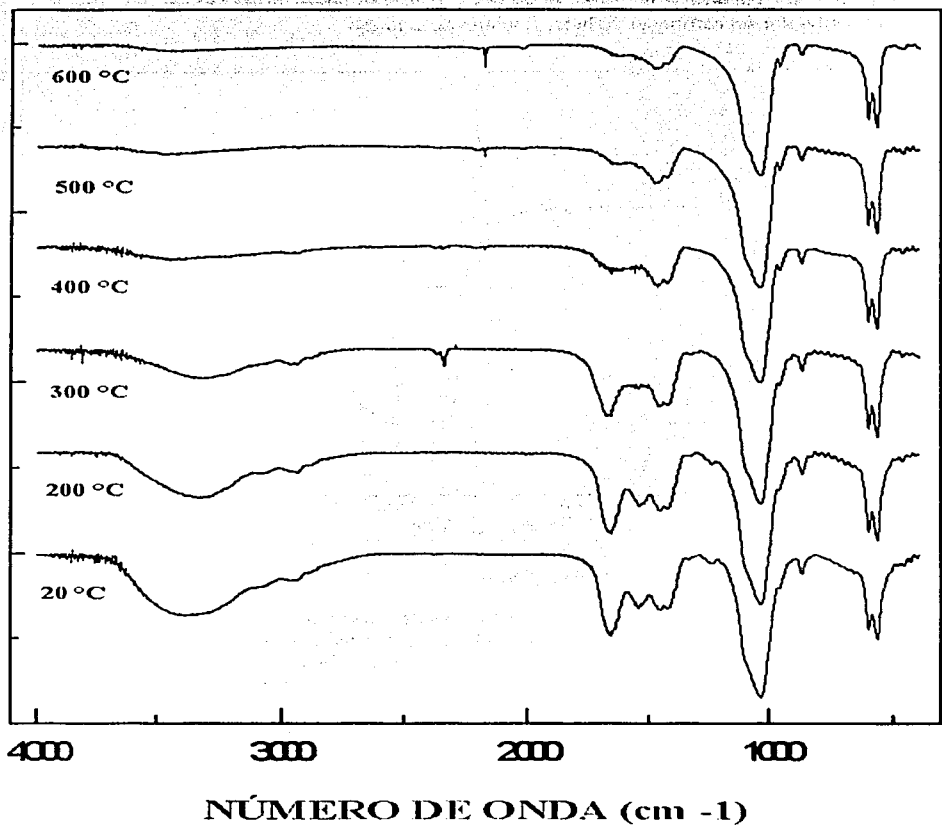


Fig. 11. Espectro IR de la muestra de México tratada a diferentes temperaturas.

Tabla 4. Asignaciones de las respectivas bandas de los grupos funcionales del espectro IR de la muestra ósea México.

Número de onda cm^{-1}	TIPO DE ENLACE
560	Desdoblamiento del grupo $(\text{PO}_4)^{4-}$
890-840	Carbonato $(\text{CO}_3)^{2-}$
1030	Estiramiento del enlace P-O del grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$
1100	Asimétrico carbonato $(\text{CO}_3)^{2-}$
1250	Desdoblamiento N-H, (Amida 3) estiramiento C-N y C-C
1340	Deformación P-OH
1370	Carbonato $(\text{CO}_3)^{2-}$ / bicarbonato $(\text{HCO}_3)^{-}$
1420	Asimétrico carbonato $(\text{CO}_3)^{2-}$
1470	Estiramiento carbonato $(\text{CO}_3)^{2-}$
1550	Estiramiento C-N (Amida 2) y desdoblamiento N-H (Amida 2)
1650	Estiramiento C=O (Amida 1)
2920	Estiramiento enlace C-C
3100	Amida (B)
3330	Estiramiento N=H (Amida A)
3400	Estiramiento O-H

En la figura 11 se observa una disminución clara y gradual de la banda a 3400 cm^{-1} , la cual, corresponde al modo de estiramiento del grupo O-H del agua estructural desde los $20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta los $400 \text{ }^\circ\text{C}$ donde prácticamente ha sido liberada toda el agua fisisorbida y quimioadsorbida, ésta última de los $200 \text{ }^\circ\text{C}$ en adelante. La banda correspondiente al estiramiento del enlace C-H, 2960 cm^{-1} , disminuye gradualmente hasta $400 \text{ }^\circ\text{C}$, valor en el cual todavía es observable, siendo hasta los $500 \text{ }^\circ\text{C}$ que desaparece por completo.

Se observa que el pico de la banda del enlace C=O disminuye notoriamente hasta los $400 \text{ }^\circ\text{C}$, teniendo todavía a los $300 \text{ }^\circ\text{C}$ una forma de pico, mientras que a los $400 \text{ }^\circ\text{C}$ continúa disminuyendo pero en menor proporción. Por otro lado, la banda del enlace N-H ha perdido su forma de pico a los $300 \text{ }^\circ\text{C}$ mientras que a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ permanece, cuando todavía no se ha iniciado el proceso de degradación y/o combustión, y al igual que la banda del C=O sigue disminuyendo en menor proporción.

Las bandas de la hidroxiapatita corresponden a los grupos fosfato y carbonato y no cambian con respecto a la temperatura ya que como se vio en el ATG, los carbonatos salen después de los $600 \text{ }^\circ\text{C}$ y con respecto a los grupos fosfatos, estos no presentan cambios hasta temperaturas más altas (Fang, Y. et al. 1994).

4.1.4. Cromatografía de Gases.

Con la columna Carboxen 1000 se obtuvieron los mejores resultados como se observa en la Fig. (12). En todas las temperaturas se registró la presencia de O_2 y de CO_2/NO_2 , mientras que para los otros gases que detectaba la columna (CO/N_2 y N_2O) sólo a determinadas temperaturas se registro su presencia. Se puede observar claramente un aumento de CO_2/NO_2 de los 300 a los $550 \text{ }^\circ\text{C}$, y en el mismo intervalo una disminución de

las unidades de área del O_2 , lamentablemente esta columna no logra diferenciar entre el CO_2 y el NO_2 . Por otro lado, se puede observar también la salida de CO/N_2 aunque en menor proporción. A los $700\text{ }^\circ\text{C}$ se observa una vez más un aumento del CO_2/NO_2 posiblemente debido a la salida de los carbonatos de la estructura de la hidroxiapatita.

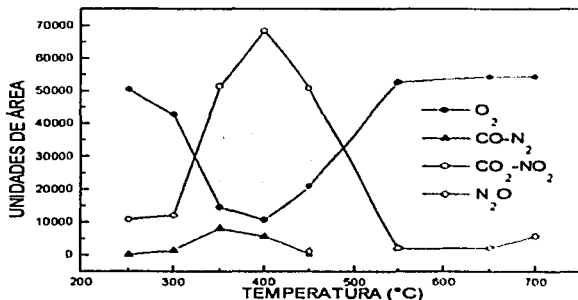


Fig. 12. Cromatografía de gases de la muestra México con la columna Carboxen 1000.

Con la columna Parapak N Porous Polymers únicamente se detectó O_2 y CO_2 desde los $250\text{ }^\circ\text{C}$ hasta los $800\text{ }^\circ\text{C}$ con un máximo de las unidades de área del CO_2 en $350\text{ }^\circ\text{C}$, y otro aumento a los $500\text{ }^\circ\text{C}$, teniendo el O_2 , como es de esperarse, el comportamiento inverso con dos mínimos a 350 y $500\text{ }^\circ\text{C}$ como se puede observar en la Fig. (13). Con la columna Sieve 5s sólo se observa el mismo comportamiento del O_2 , ya que el CO y N_2 que se registraron fueron de unidades de área muy bajas en el intervalo de 350 a $400\text{ }^\circ\text{C}$ y de 400 a $450\text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente (Fig. 14).

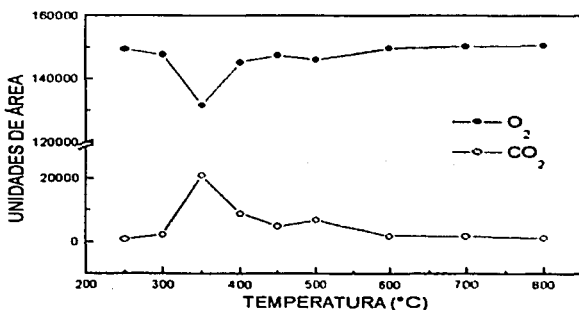


Fig. 13. Cromatografía de gases de la muestra México con la columna Parapak N Porous Polymers.

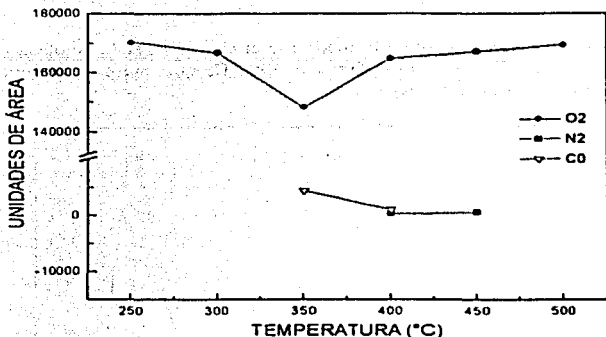


Fig. 14. Cromatografía de gases de la muestra México con la columna Sieve 5s.

4.2. Colágeno tipo I.

4.2.1. Calorimetría de Barrido Diferencial.

El colágeno tipo I extraído del hueso de Granada, presenta un termograma distinto al del hueso, siendo que en ambos casos la señal corresponde únicamente a la degradación y combustión de la proteína. En la figura (15) se observan 3 picos exotérmicos, el primero de baja intensidad a los 340 °C, mientras que los siguientes dos son picos bastante pronunciados y de una alta intensidad a los 485 y 530 °C. El valor de $T_{max} = 530$ °C es mayor que en el caso del hueso, lo cual muestra que se tiene una mayor estabilidad térmica.

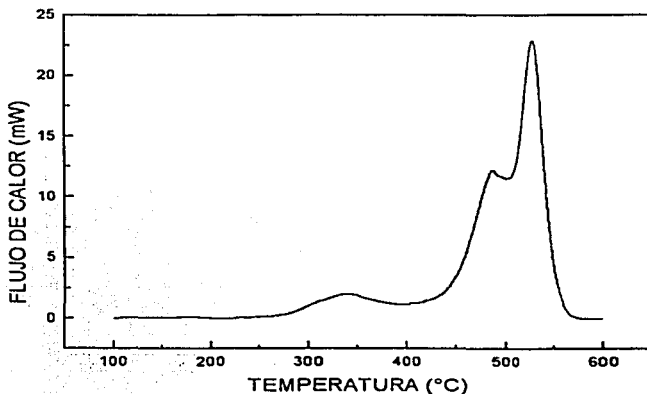


Fig. 15. Termograma del colágeno extraído de la muestra Granada.

Para el caso del colágeno obtenido mediante el uso de EDTA, se observa así mismo un pico exotérmico (Fig. 16), con una T_{max} a 500 °C, que muestra al igual que en el anterior caso una alta estabilidad térmica.

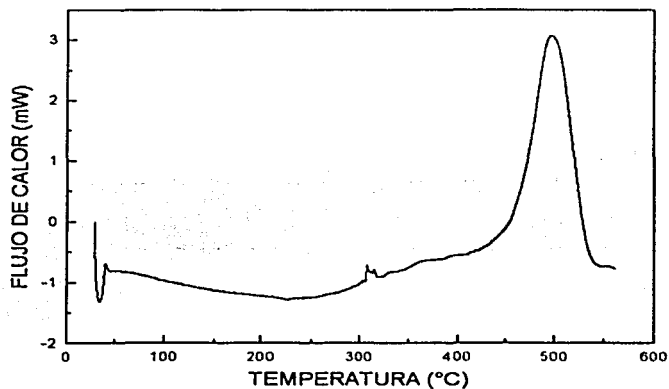


Fig. 16. Termograma del colágeno obtenido mediante EDTA.

Si se observa la estabilidad térmica del colágeno Sigma, que proviene de tendón de Aquiles de bovino, se encuentra también una alta estabilidad (Fig. 17). $T_{max} = 490$ °C, con 3 picos exotérmicos fácilmente distinguibles a 180, 300 y 490 °C.

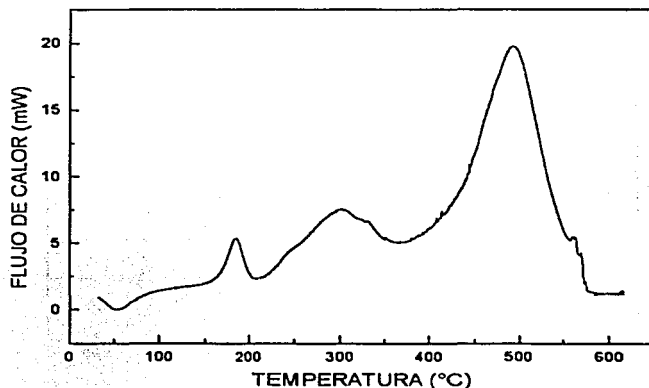


Fig. 17. Termograma del colágeno Sigma-Aldrich.

De las anteriores muestras, se obtuvo el valor de la entalpía de la degradación y combustión del colágeno (tabla 5). Estos valores resultan similares a los valores de las muestras de hueso.

Tabla 5. Valores de entalpía para las muestras de colágeno.

Muestra	No. de medidas	ΔH (kJ/g) Promedio
EXT-Colágeno	3	-8.89 ± 0.07
EDTA-Colágeno	3	-7.91 ± 1.01
Sigma-Colágeno	3	-7.39 ± 1.39

4.2.2. Análisis Térmico Gravimétrico de Colágeno.

En el análisis térmico gravimétrico del colágeno extraído (Fig. 18) se observa una primera pérdida correspondiente al agua fisiabsorbida. Posteriormente, empieza la pérdida de masa a 165 °C debida a la degradación y combustión del colágeno hasta los 600 °C, quedando un 7.3% de masa que corresponde a la hidroxiapatita que no fue retirada por completo por el método de extracción.

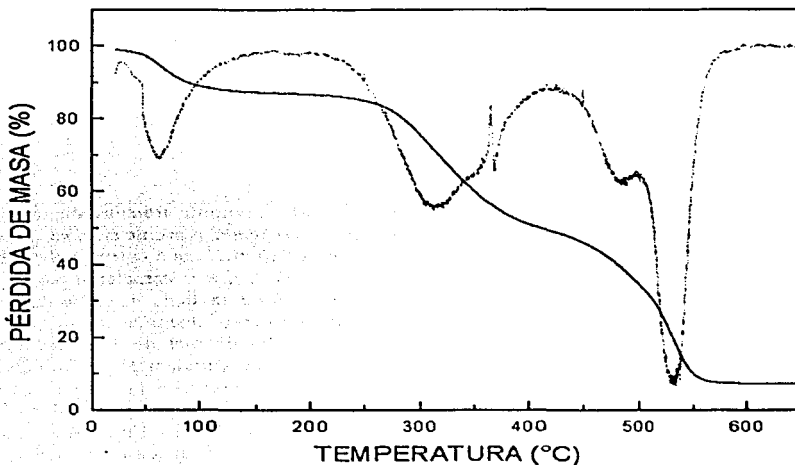


Fig. 18. Curva termogravimétrica del colágeno extraído de la muestra ósea Granada.

Para el caso del colágeno Sigma (Fig. 19) la pérdida de masa es total y termina hasta los 650 °C, a diferencia de la calorimetría, donde acaba antes de los 600 °C, esto posiblemente sea debido a un efecto de la cantidad de colágeno que se utilizó, 20 mg, en la prueba de ATG, en comparación con la de 1 mg que se utilizó en el calorímetro.

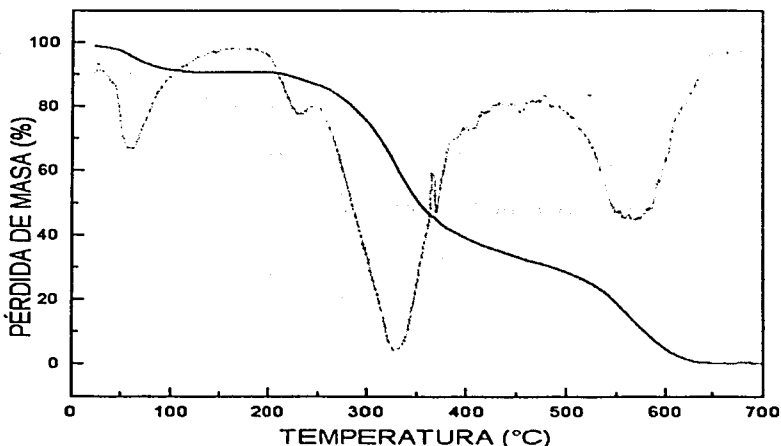


Fig. 19. Curva termogravimétrica del colágeno Sigma-Aldrich.

4.2.3. Espectroscopía Infrarroja de Colágeno.

La espectroscopía infrarroja del colágeno extraído mediante tratamiento térmico (Fig. 20), tiene marcadas diferencias con respecto a la del colágeno presente en hueso, estas diferencias son más claras en la región que va de 1500 a 400 cm^{-1} , que corresponden a la región donde las vibraciones o bandas de absorción de los enlaces característicos de la hidroxiapatita aparecen, como se mostró en la Fig. (11) y en la tabla 4, en la cual, se muestran dichas asignaciones. Las vibraciones desaparecen y/o disminuyen, cuando el cristal es retirado permitiendo que aparezcan distintas señales de menor intensidad de la proteína que se encontraban ocultas. Además de las bandas correspondientes a la Amida I y II, aparecen a menores números de onda otras bandas del colágeno, siendo una de las más características, y que no se observan en el IR de hueso, la banda de la Amida III a 1240 cm^{-1} . Hay otras bandas que aparecen a 1450, 1400, 1330, 1240, 1160, 1120, 1080 y 1030 cm^{-1} , y aunque no para todos se tiene asignado a qué vibración de enlace corresponde, es característico que la gran mayoría desaparezca aproximadamente a 300 °C.

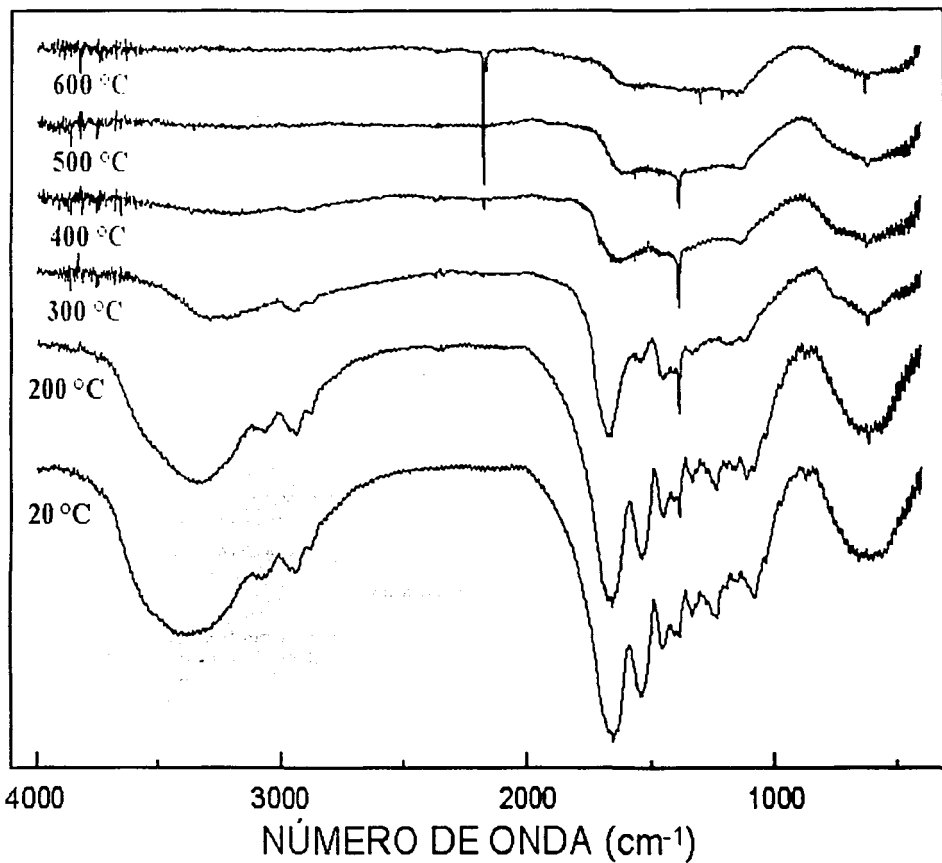


Fig. 20. Espectro IR de la muestra de colágeno extraído

4.3. Hidroxiapatita.

4.3.1. Calorimetría de Barrido Diferencial.

En el caso de la hidroxiapatita Sigma, se encontró que para la calorimetría no existe ninguna señal por parte del cristal (Fig. 21a), este mismo resultado se observa cuando se vuelve a meter por segunda vez al calorímetro una muestra de hueso (Fig. 21b). Puesto que se supone que la totalidad de la masa del colágeno presente en el hueso se ha perdido por el proceso de combustión durante la primera corrida, toda señal que se obtenga en la segunda corrida corresponderá a la hidroxiapatita.

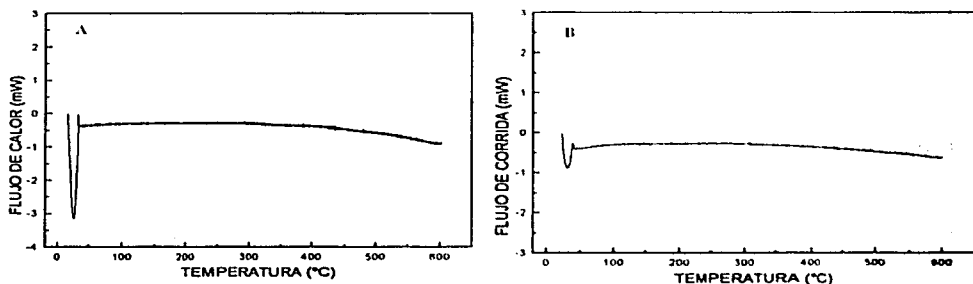


Fig. 21. Termogramas de A) Hidroxiapatita Sigma y B) segunda corrida de la muestra ósea Granada

4.3.2. Análisis Térmico Gravimétrico de Hidroxiapatita.

El ATG de la hidroxiapatita Sigma (fig. 22) muestra una pérdida de masa de 3% desde temperatura ambiente hasta 200 °C, debida al agua fisiabsorbida, posteriormente, no se observa prácticamente ningún cambio de masa hasta los 900 °C. En este caso la hidroxiapatita Sigma no presenta una alta sustitución de carbonatos como la hidroxiapatita de origen biológico.

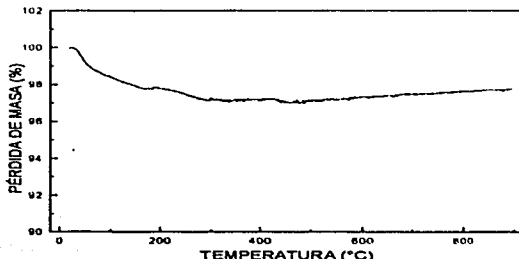


Fig. 22. Curva termogravimétrica de la hidroxiapatita Sigma.

4.3.3. Espectroscopía Infrarroja de Hidroxiapatita.

En la fig. (23) se muestran los espectros IR del cristal del hueso obtenidas a diferentes temperaturas, donde se observan las bandas correspondientes a los carbonatos como el caso de la banda a 875 cm^{-1} , los cuales, como fue mencionado (Peters, et al. 2000) puede obtenerlos a partir del CO_2 atmosférico durante su síntesis y no desaparecen, ya que el tratamiento térmico se llevó hasta los $600\text{ }^\circ\text{C}$, en si los espectros no presentan prácticamente cambio alguno. Las bandas que predominan corresponden a las diferentes vibraciones del grupo fosfato, como son las de 560 y 1030 cm^{-1} , ésta última, ha sido empleada (Pleshko, et al. 1991) para obtener índices de cristalinidad en huesos modernos y antiguos. Los cambios que se observan en la región de 3000 a 3600 cm^{-1} , corresponden a la deshidratación de la muestra.

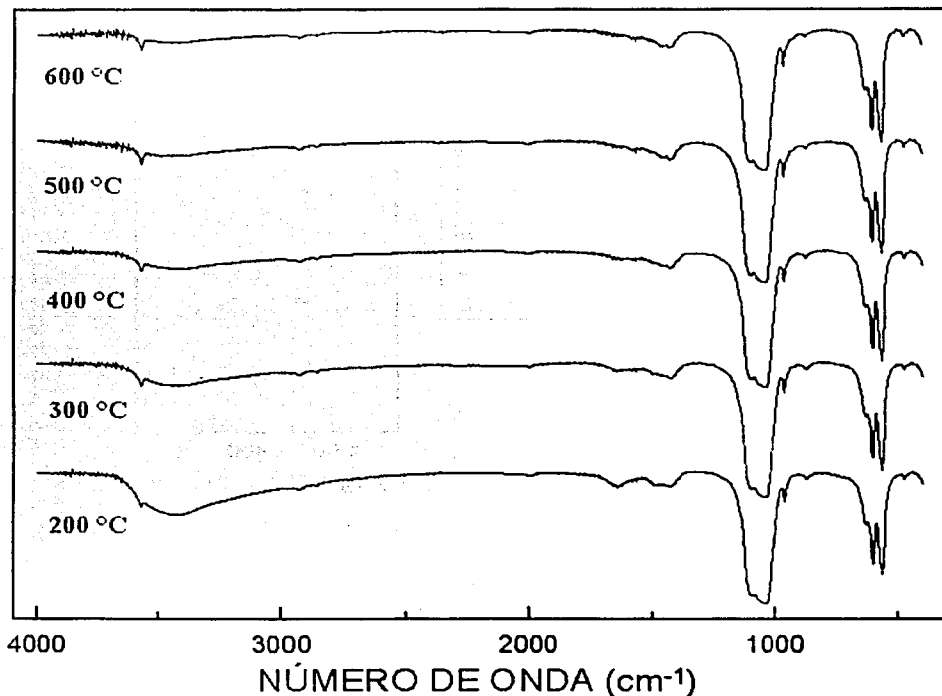


Fig. 23. Espectro IR de la muestra de hidroxiapatita Sigma.

4.4. Muestras Arqueológicas.

4.4.1. Calorimetría de Barrido Diferencial.

Prácticamente todos los termogramas de las muestras arqueológicas son semejantes entre sí en lo que respecta a su forma y la presencia de picos exotérmicos y endotérmicos. En la figura 24, se comparan los termogramas de todas las muestras arqueológicas y se observa la presencia de un primer pico exotérmico de mayor intensidad alrededor de los 350 °C y un hombro, en algunos casos muy disminuido, alrededor de los 440 °C.

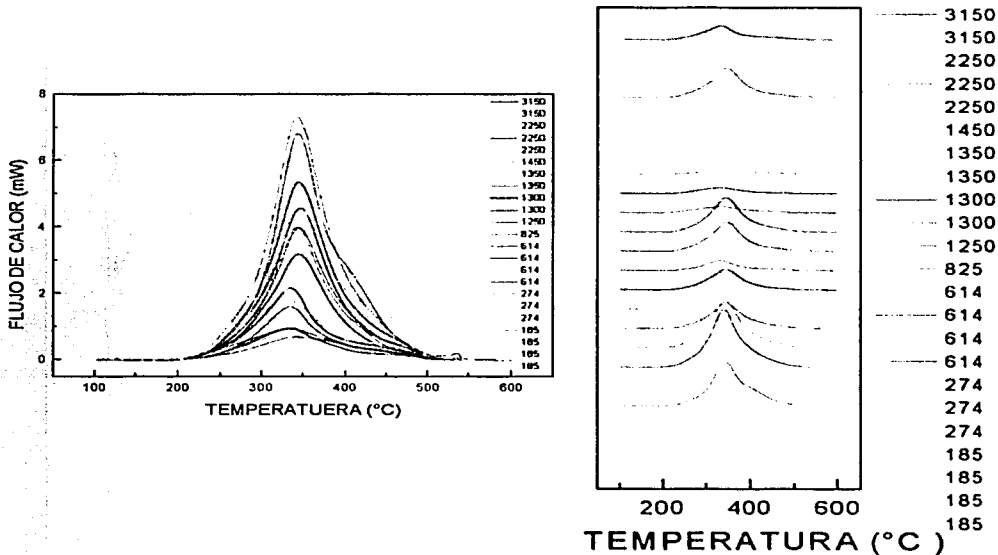


Fig. 24. Termogramas de todas las muestras arqueológicas analizadas. Al lado derecho de cada figura se muestra la respectiva antigüedad de cada muestra.

En la tabla 6 se muestran los valores de entalpia obtenidos para las muestras arqueológicas así como sus respectivas antigüedades. En el caso de éstas muestras, se obtuvo el valor de la entalpia utilizando la masa total (2.0 mg) empleada en el calorímetro para poder comparlas. Cabe mencionar, que todas las muestras fueron analizadas utilizando la misma masa. La desviación estándar, se obtuvo realizando tres repeticiones para cada muestra, a excepción de Xochimilco ent. 17 debido a que no se contaba con suficiente muestra.

Tabla 6. Valores de entalpía por unidad de masa de muestra arqueológica analizada y antigüedades de las muestras arqueológicas.

MUESTRA	ENTALPÍA (J/g)	EDAD (años)
Tlatilco Ent. 27	-688.1 ± 27.11	3150 +/- 150
Tlatilco Ent. 197	-1202.27 ± 86.64	3150 +/- 150
Cuicuilco A.	-422.06 ± 70.60	2250 +/- 350
Cuicuilco I.	-313.33 ± 35.84	2250 +/- 350
Oztoyohualco Ent. 14	-1586.86 ± 27.90	1450 +/- 100
Xcambio	-688.34 ± 31.29	1350 +/- 150
Bonampak	-315.06 ± 37.29	1350 +/- 150
Tlalocan Ent. 2	-471.61 ± 124.91	1300 +/- 100
Tlalocan Ent. 15	-418.88 ± 33.49	1300 +/- 100
Xochimilco Ent. 17	-1613.16	1250 +/- 150
Xochimilco Ent. 1	-983.36 ± 56.37	825 +/- 75
Xochimilco Ent. 9	-529.32 ± 29.58	614.5 +/- 135.5
Xochimilco Ent. 13-B	-997.83 ± 31.29	614.5 +/- 135.5
Xochimilco Ent. 15	-1400.13 ± 62.50	614.5 +/- 135.5
Tlatelolco C6 T8	-1431.14 ± 197.70	614.5 +/- 135.5
Xochimilco Ent. 14-A	-1476.43 ± 93041	614.5 +/- 135.5
San Jerónimo 1	-2224.56 ± 82.51	274.5 +/- 99.5
San Jerónimo 3	-2522.86 ± 14.11	274.5 +/- 99.5
San Jerónimo 4	-1883.65 ± 5.35	274.5 +/- 99.5
San Pedro San Pablo U1 Ent. 1	-2153.66 ± 159.91	185 +/- 25
San Pedro San Pablo U7 Ent. 5	-814.96 ± 90.03	185 +/- 25
San Pedro San Pablo U7 Ent. 16	-1860.98 ± 115.64	185 +/- 25
San Pedro San Pablo U7 Ent. 18	-1596.79 ± 27.14	185 +/- 25

En la figura (25a) se observa la relación entre la entalpía de los huesos arqueológicos y su respectiva antigüedad. La figura (25b) muestra la misma gráfica que la (25a) pero sin las muestras adicionales con las que se trabajó en el CBD, en ambos casos se ajustó una curva de decaimiento exponencial del proceso de pérdida de colágeno. Las muestras adicionales no fueron analizadas anteriormente debido a no ser originarias del Valle de México o porque Jang no las consideró adecuadas. Se puede observar que en ambos casos, la curva presenta las mismas características.

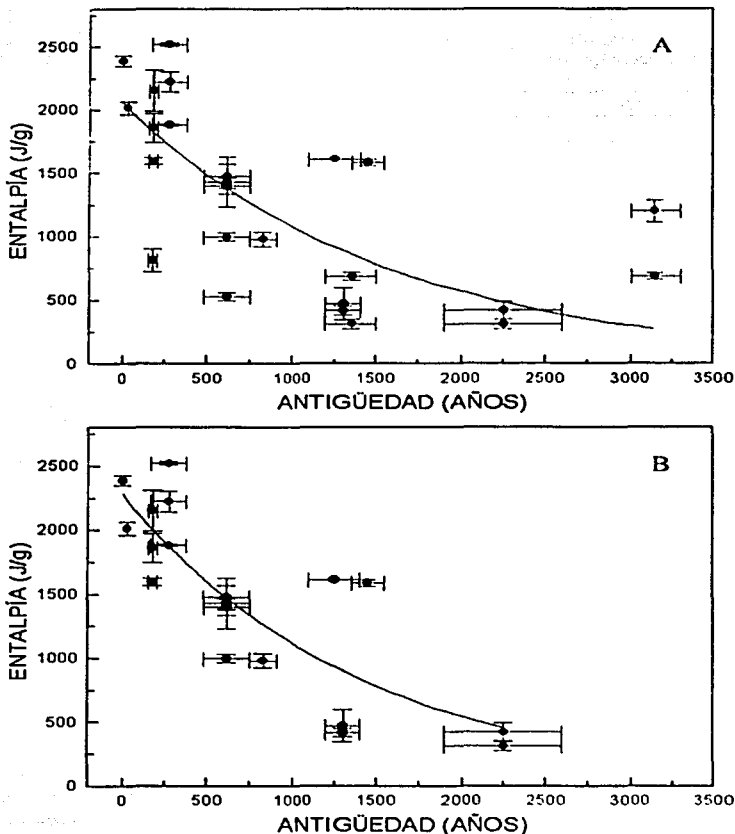


Fig. 25. Relación de la entalpia y la antigüedad de los huesos arqueológicos. A) Se analizaron muestras óseas estudiadas previamente y en B) se adicionaron muestras no estudiadas que se encuentran en círculos.

Con las muestras arqueológicas, se había realizado anteriormente análisis de difracción de rayos X del cual se obtuvo una relación del número de cuentas con respecto a la antigüedad (Fig. 26) y así mismo se hizo un análisis elemental para obtener la relación de Nitrógeno/Calcio con respecto a la antigüedad (Fig. 27). Estos análisis son de gran utilidad para comparar aquellos obtenidos mediante el Calorímetro, por ende se ajustaron también sus respectivas curvas de decaimiento exponencial que muestran la pérdida del colágeno.

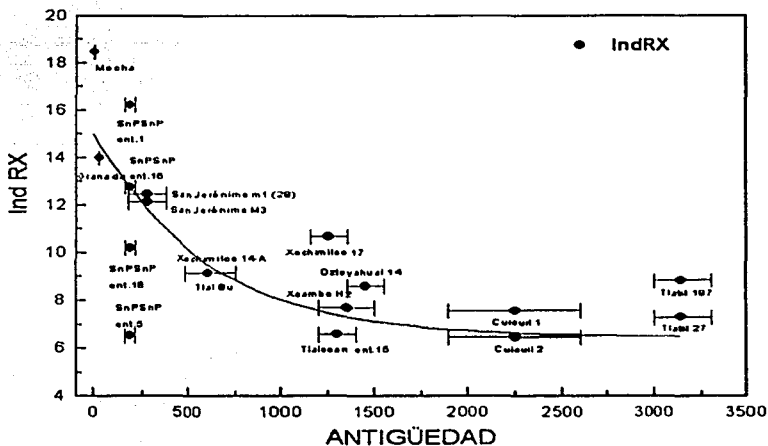


Fig.26. Análisis de difracción de rayos X con respecto a la antigüedad de las muestras arqueológicas (Heredia, 2000).

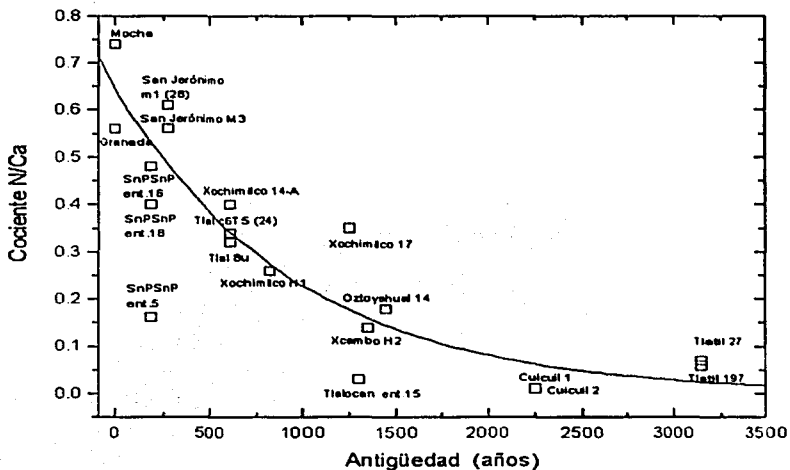


Fig. 27. Análisis elemental donde se obtiene la relación N/Ca contra la antigüedad de las muestras arqueológicas. La relación de N/Ca = 0.6 es considerando una fórmula de $C_4H_{3.7}O_{1.3}NS_{0.05}$ para el colágeno con una proporción de 30% en peso en hueso seco actual.

En la figura (28) se observan las comparaciones entre las curvas termoanalíticas a sus respectivas antigüedades. Es notable en la mayoría de las gráficas que ciertas muestras se salen de lo esperado, éstas son las mismas que en la Fig. (25) se separan en mayor proporción de la curva que muestra la tendencia global de todos los puntos.

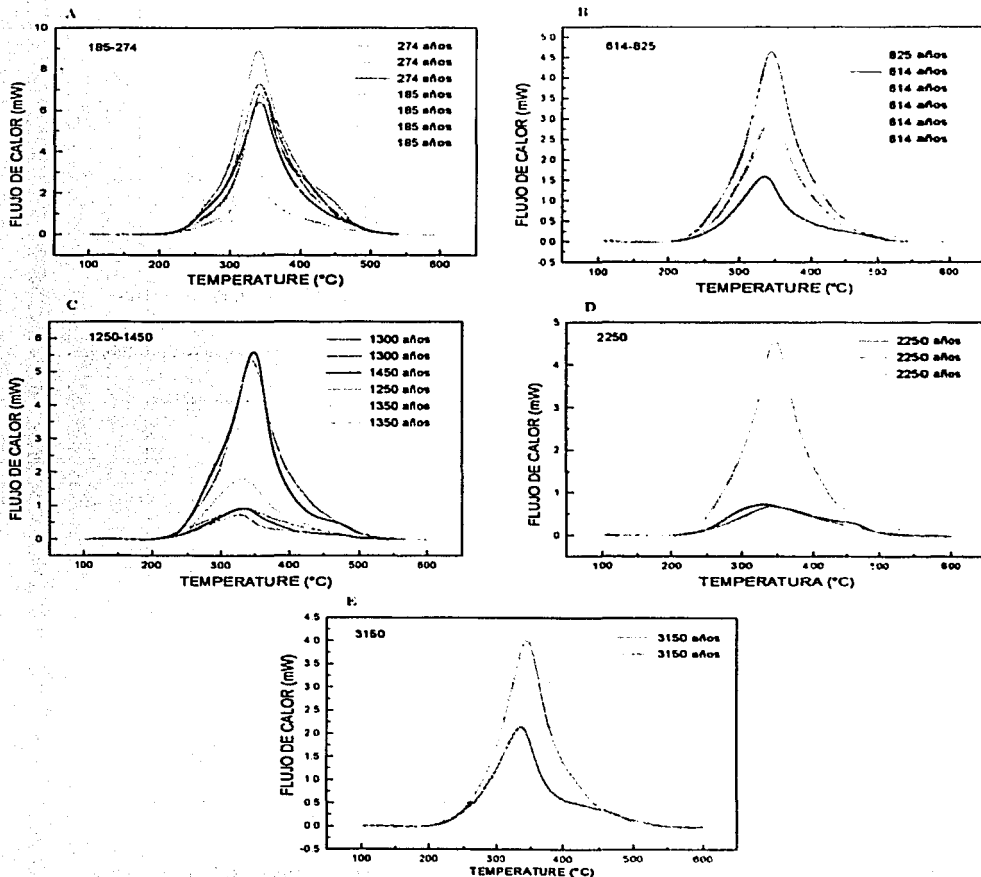


Fig. 28. Termogramas de los huesos arqueológicos en los cuales se comparan muestras de antigüedades similares. A) 185-274 años, B) 614-825 años, C) 1250-1450 años, D) 2250 años y E) 3150 años.

A partir de los resultados que se muestran en la Fig. (25) se pueden ajustar diferentes curvas de decaimiento exponencial para la pérdida de colágeno dependiendo del conjunto de muestras que se tomen. En la figura (29) se ajustaron 3 curvas las cuales, muestran un ritmo de pérdida distinto con respecto a la antigüedad.

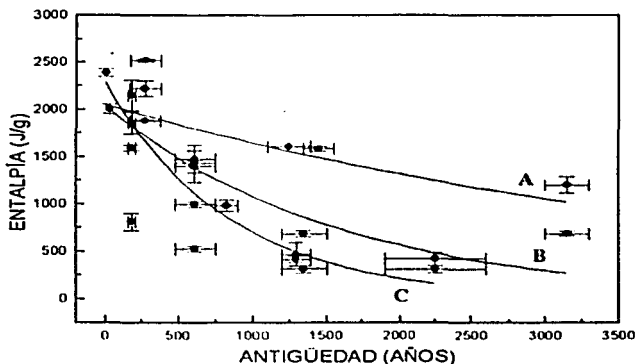


Fig. 29. Gráfica de los valores de entalpia de las muestras arqueológicas contra la antigüedad donde se muestran 3 curvas de decaimiento exponencial de la pérdida de colágeno.

4.4.2. Análisis Térmico Gravimétrico.

El análisis térmico gravimétrico de los huesos arqueológicos (Fig. 30) muestra que la pérdida de colágeno hasta 600 °C no depende de la antigüedad de la muestra, lo cual corrobora los resultados obtenidos mediante la calorimetría de barrido diferencial.

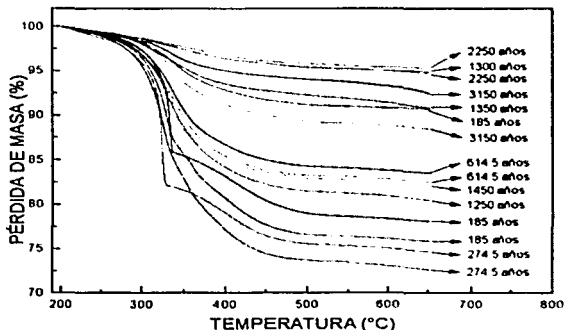


Fig. 30. Comparación de las curvas térmico gravimétricas de las muestras arqueológicas.

En la figura (31) se observa la relación entre las distintas proporciones de colágeno de las huesos arqueológicos obtenidos a partir de las curvas de la fig. (30) y la antigüedad de dichas muestras, y se observa, que es similar a la figura (25). Así mismo, se le ajustó una curva de decaimiento exponencial que muestra gráficamente la pérdida del colágeno.

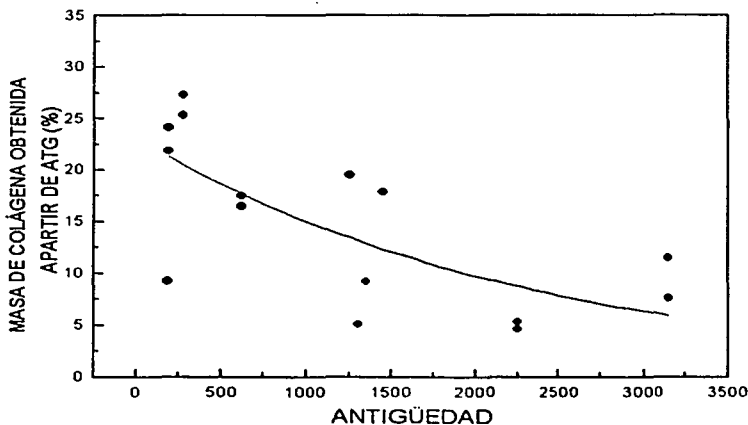


Fig. 31. Relación entre la masa de colágeno obtenida a partir del ATG de cada muestra arqueológica con respecto a la antigüedad de las mismas.

4.5. Muestras Paleontológicas.

4.5.1. Calorimetría de Barrido Diferencial.

Las muestras paleontológicas como se mencionó previamente, fueron analizadas en trozos. La señal presenta poca intensidad y su interpretación resulta difícil, ya que en algunos casos estas presentan picos a temperaturas que otras muestras no tienen, lo cual lleva a considerar también el tipo de efectos que ha tenido el proceso de fosilización en dichas muestras. En la figura (32) se observan aquellas muestras paleontológicas de varios millones de años en las que se obtuvo una señal clara mientras que, en otras era de muy poca intensidad o resultaba complicado asignar la línea base para obtener el área bajo la curva.

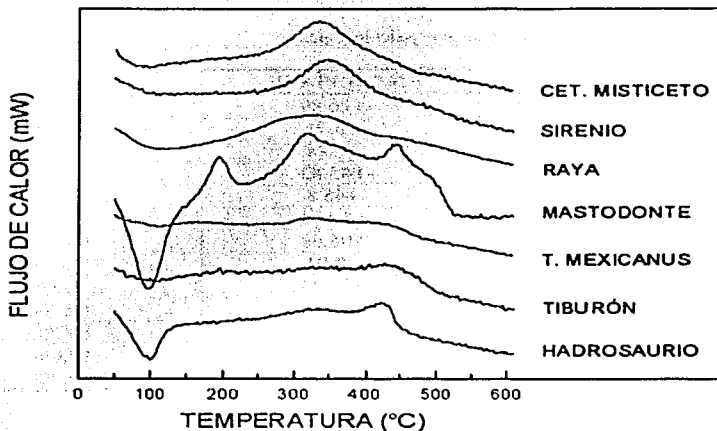


Fig. 32. Termogramas de las muestras paleontológicas.

Para las muestras de mamut de 10000 años de antigüedad, se obtuvieron los termogramas que se muestran en la Fig. (33). Estas muestras fueron analizadas en polvo porque se obtenían señales que permitían obtener el área bajo la curva. En la tabla 7, se muestran los valores de entalpía de las muestras paleontológicas analizadas.

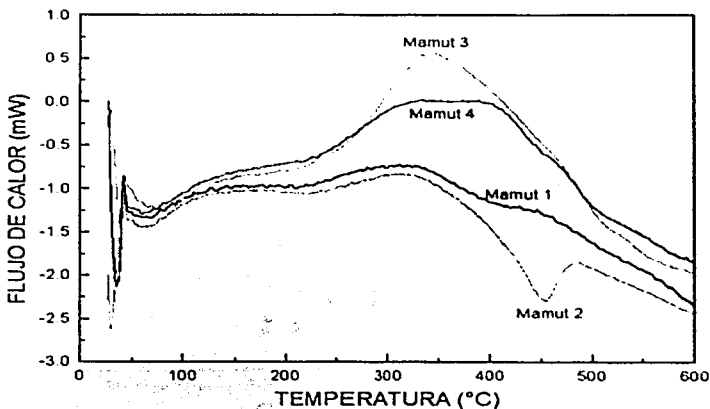


Fig. 33. Termogramas de las muestras de mamut de aproximadamente 10000 años de antigüedad.

Tabla 7. Valores de entalpía de las muestras paleontológicas.

MUESTRA	ENTALPIA (J/g)	EDAD (años)
Hadrosaurio (<i>Hadrosaurus sp.</i>)	-116.89	73,000,000
Atún (<i>Thunnus sp.</i>)	-63.71	15,000,000
Cetáceo Odontoceti	-58.74	15,000,000
Cetáceo Mysticeti	-143.83	15,000,000
Raya (<i>Raja sp.</i>)	-145.8	15,000,000
Sirénio (<i>Trichechus sp.</i>)	-159.64	15,000,000
Tiburón (<i>Squatina sp.</i>)	-105.68	9,000,000
Otárido (<i>Thalassoleon mexicanus</i>)	-68.04	9,000,000
Mastodonte (<i>Gomphotherium sp.</i>)	-296.24	1,000,000
Mamut 1 (<i>Mammuthus sp.</i>)	-129.68	10,000
Mamut 2 (<i>Mammuthus sp.</i>)	-137.8	10,000
Mamut 3 (<i>Mammuthus sp.</i>)	-373.08	10,000
Mamut 4 (<i>Mammuthus sp.</i>)	-267.14	10,000

A partir de todas las muestras óseas estudiadas, se presenta en la figura (34) la relación de la entalpía con respecto a la antigüedad. En este caso, se observa claramente que según aumenta la antigüedad la cantidad de colágeno disminuye. Se introdujo un cambio de escala en el eje que marca la antigüedad, con el fin de poder observar el comportamiento de los valores de entalpía de las muestras de poca antigüedad.

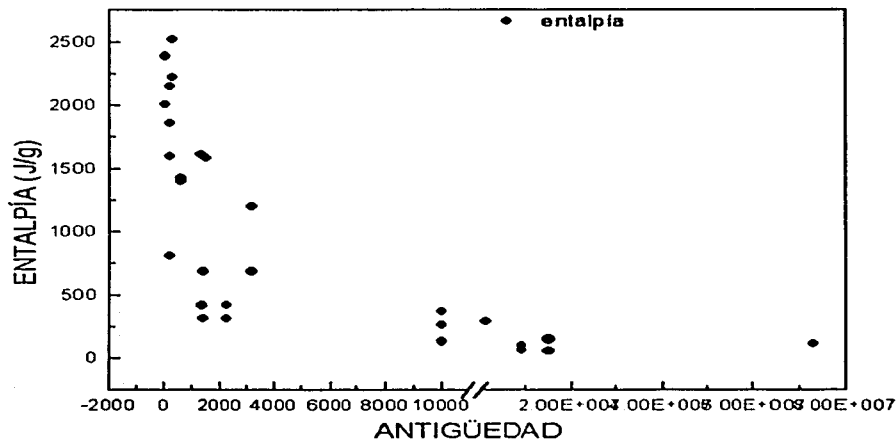


Fig. 34. Comparación de los valores de entalpía de todas las muestras analizadas con respecto a su antigüedad.

5. DISCUSIÓN

5.1 Estabilidad Térmica del Colágeno Tipo I

La estabilidad térmica de distintas proteínas, en especial la del colágeno tipo I, se ha estudiado ampliamente en lo referente al proceso de desnaturalización (Komsa-Penkova, R., 1999; Rochdi, A., 2000; Miles, C. A., 1995; Miles, C. A., 1998) mediante el uso del calorímetro en un intervalo de temperatura de 20 a 80 °C. En dichos trabajos, la estabilidad térmica se determina a partir de la T_{max} a la cual, se origina la desnaturalización, presentándose alrededor de los 60 °C (ver apéndice II). En lo concerniente al proceso de degradación y combustión del colágeno tipo I, en el presente trabajo se ha empleado el mismo criterio para establecer la estabilidad térmica mediante la T_{max} del pico exotérmico de mayor intensidad.

Los dos huesos actuales, Granada y México, presentan características semejantes en los termogramas del calorímetro (Fig. 6), lo cual indica, que su estabilidad térmica es similar. El proceso exotérmico que tiene lugar de los 220 a los 530 °C, corresponde a la degradación y combustión del colágeno, entendiéndose cada uno como la ruptura de una molécula en fragmentos más pequeños y la oxidación total de una sustancia hasta determinados óxidos en forma de gas (NO_2 , NO , CO_2 , CO , SO_2 , etc.) respectivamente. En el caso de los colágenos extraídos de huesos actuales (Fig. 15 y 16) y el colágeno Sigma (Fig.17) se observa que tienen una mayor estabilidad térmica en comparación con las muestras óseas, siendo que presentan unos T_{max} cercanos a 550 °C mientras que para el colágeno presente en hueso el T_{max} está alrededor de los 350 °C.

Se ha propuesto que el colágeno que se encuentra en la matriz extracelular presenta cambios durante la formación de los cristales de hidroxiapatita, en otras palabras, durante la mineralización, lo cual provoca el rompimiento de entrecruzamientos entre las moléculas de colágeno de distintas triple hélices. Debido a lo anterior, la estabilidad térmica disminuye cuando la proteína se encuentra en el hueso (Sakae et al. 1995). Pero esta explicación no resulta convincente bajo el resultado obtenido de que el colágeno extraído del hueso por ambos métodos es térmicamente más estable, ya que es de suponerse que este colágeno ha perdido los entrecruzamientos y aun así su estabilidad aumenta al ser separado de la fase cristalina. En los casos en que estos enlaces no se perdieran se requeriría una mayor energía para degradar la proteína, lo cual ocasionaría que la temperatura en la que se registran los picos exotérmicos sea mayor.

Para el caso del colágeno extraído mediante el tratamiento térmico, se puede suponer que dicho tratamiento aporta la energía necesaria para la formación de diferentes enlaces entre las moléculas, además de que pudiera provocar un estado de agregación diferente al del colágeno en hueso, lo que trae como consecuencia cambios en la conformación estructural de la proteína. Lo anterior, originaría un aumento de la estabilidad térmica del colágeno cuando este es deshidratado y posteriormente analizado. En el caso de la obtención de colágeno mediante EDTA, no se puede utilizar este mismo razonamiento, en tal caso, sólo se puede argumentar un efecto del cristal sobre la estabilidad térmica de la proteína, ya que la extracción no debería de tener ningún efecto sobre esta.

La muestra de colágeno Sigma, sirve de comparación ya que proviene de un tejido sin mineralizar, y que naturalmente no se mineraliza. Se observa que el colágeno si presenta una alta estabilidad anterior a la mineralización, por lo que se podría pensar que el cristal si tiene algún efecto sobre su estabilidad, lo cual es bastante claro mediante la Calorimetría.

Los valores de ΔH de los huesos actuales obtenidos a partir del área bajo la curva de los procesos exotérmicos, resultaron semejantes y reproducibles, esto es importante mencionarlo porque en algunas investigaciones, se menciona la dificultad de obtener señales que mantengan el mismo comportamiento térmico para el caso específico de huesos (Nielsen et al. 2000). En la literatura no existen valores de ΔH del colágeno de hueso reproducibles obtenidos mediante calorimetría, relacionados con los resultados de termogravimetría, de la cual se obtiene la proporción de colágeno en hueso, que representen solamente la combustión de la proteína. Sakae et al. 1995. reporta valores de ΔH del colágeno de dentina, -13.86 ± 0.52 kJ/g, los cuales difieren de los valores obtenidos en el presente trabajo, -8.39 ± 0.15 y -8.42 ± 0.11 kJ/g, esto se puede deber al tratamiento que se le dio a la muestra, lo que puede ocasionar distintos tipos de señales en el CBD, ya que realizaron su estudio con trozos de dentina y no con dentina en polvo.

Los valores de ΔH de las muestras de colágeno son similares a aquellos de las muestras óseas actuales. Para el caso del colágeno extraído mediante tratamiento térmico, resulta ser de -8.89 ± 0.07 kJ/g. El aumento en la entalpia, se puede deber a un estado de agregación distinto como bien se mencionó anteriormente. Mientras que para el colágeno obtenido mediante EDTA es de -7.91 ± 1.01 kJ/g, la disminución de la entalpia, se puede deber a la presencia de cristales de hidroxiapatita que no fueron retirados mediante el EDTA. Estos cristales, afectan el valor de la masa estimada para el colágeno, es decir, del total de la masa considerada en la ecuación para obtener la entalpia, cierta proporción pertenecía al cristal, el cual no presenta ninguna señal exotérmica en el rango de la combustión del colágeno y por ende el área bajo la curva del termograma no representa la combustión de un 100% de masa de la proteína.

Las características de los termogramas de las muestras óseas y de las muestras de colágeno tipo I extraído, junto con la semejanza de los valores de entalpia de dichas muestras, sugieren que al desmineralizar el hueso, en el colágeno no se pierden y tampoco se originan algún tipo de enlaces nuevos o diferentes que alteren su estabilidad y por ende la entalpia de combustión. Por lo cual, se le puede atribuir a la presencia del cristal, la baja estabilidad térmica que presenta el colágeno en el hueso en comparación de cuando se encuentra en ausencia del mineral. Se desconoce la forma en que se lleva a cabo este efecto sobre la estabilidad, si la presencia de la fase mineral provoca cambios estructurales en la proteína o los cristales actúan como núcleos de degradación al almacenar calor, son posibilidades a analizar para conocer a fondo este fenómeno. Así mismo, estos resultados sugieren que durante el proceso de mineralización tampoco se afecta en gran medida al colágeno respecto a los enlaces que se tienen entre las moléculas, ya que si sucediera lo contrario, presentaría unos valores de entalpia muy diferentes entre el colágeno en presencia y en ausencia de la fase mineral.

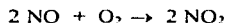
5.2 Degradación y Combustión del Colágeno Tipo I

Mediante la Espectroscopía Infrarroja y la Cromatografía de Gases, se planteó la posibilidad de conocer el proceso de degradación y combustión del colágeno tipo I en presencia de la fase mineral con el fin de comprender la disminución de la estabilidad térmica. El espectro infrarrojo, muestra las diferentes bandas de absorción de los enlaces de determinada sustancia sobre la cual incide el haz. En el caso del hueso, se muestran las bandas de los enlaces característicos de la proteína y del cristal. El enlace C-H no es empleado comúnmente en la caracterización de moléculas, debido a que su vibración es débil e inestable. Aun así, su presencia muestra que la degradación y combustión del colágeno termina aproximadamente a los 500 °C, lo cual está de acuerdo con los resultados del Calorímetro y de los análisis térmico gravimétricos. Las bandas del estiramiento del grupo C=O (Amida I), del estiramiento del enlace C-N (Amida III) y del desdoblamiento del enlace N-H (Amida II), son característicos del enlace peptídico y por consiguiente su presencia o disminución reflejan cómo se ha ido degradando la estructura de la proteína, principalmente los enlaces C-N y N-H son señales de ese rompimiento.

Los valores de transmitancia muestran en ambos casos una disminución gradual de las bandas, pero la ausencia de la señal es un claro indicador de que el enlace del N-H se ha eliminado con respecto al C=O, de ahí que a una menor temperatura desaparece la señal de la banda del N-H, que tiene una energía de enlace de 391 kJ/mol mientras que para el C=O es de 725 kJ/mol. Para el caso del enlace C-H, se observa también una disminución gradual, hasta los 400 °C siendo su energía de enlace de 415 kJ/mol, mayor que la del N-H y C-N, la cual es de 292 kJ/mol (Pauling, L. 1970). Es evidente entonces que la degradación depende de las energías de enlace entre los distintos átomos de la proteína, por lo cual se puede afirmar que la degradación se origina tanto en las cadenas laterales como en el esqueleto del colágeno, sin importar su distinta participación en las interacciones que la estabilizan. Por otra parte, resulta notorio el hecho de que el pico de N-H desaparece antes de los de C=O y C-H por lo cual, se propone que en un periodo avanzado de la degradación y combustión es mayoritaria la presencia de pequeños fragmentos de cadenas alifáticas, las cuales, posiblemente por su mayor energía de enlace, requieran una mayor temperatura para oxidarse y puedan ser las causantes del hombro derecho a 440 °C que se observa en la Calorimetría, aunque aún faltan evidencias experimentales que lo confirmen.

De las tres cromatografías de gases, se puede deducir que los principales óxidos producto de la combustión del colágeno son el CO₂ y el NO₂. Para el caso del carbono presente en la molécula, este se elimina preferentemente en forma de CO₂ ya que dicho gas, se produce al quemar compuestos de carbono en exceso de aire, mientras que el CO se produce usando cantidades limitadas de aire. En las cromatografías realizadas, la cantidad de oxígeno empleado fue de un 20% del total del flujo de aire, lo cual es semejante al porcentaje oxígeno atmosférico, de ahí que la producción de CO₂ se viera favorecida. El CO se produce en los intervalos de temperatura donde la combustión es mayor y por consiguiente la cantidad de oxígeno es baja al haberse producido una gran cantidad de CO₂, como las unidades de área lo muestran, permitiendo así la formación de CO en proporciones menores a las del CO₂.

En el caso del nitrógeno, se llegó a la conclusión de que no se libera en la forma del óxido nitroso (N₂O) ni del óxido nítrico (NO) ya que en las columnas no se encontró ningún valor en unidades de área siendo que podían detectar ambos gases. Además, el N₂O se descompone en N₂ y O₂ a temperaturas elevadas, mientras que el NO reacciona con el oxígeno instantáneamente:



Se deduce entonces que el dióxido de nitrógeno (NO₂) es el único óxido de nitrógeno que se pudo haber formado, ya que otras opciones como son el trióxido de dinitrógeno (N₂O₃), el tetróxido de dinitrógeno (N₂O₄) y el pentóxido de dinitrógeno (N₂O₅) por sus características, difícilmente serían derivados de la combustión de un polipéptido. El N₂O₃ existe puro sólo en estado sólido y en bajas temperaturas, en el líquido y en el vapor se encuentra disociado:



El N₂O₄ se encuentra relacionado con el NO₂ por el equilibrio $2 \text{NO}_2 \leftrightarrow \text{N}_2\text{O}_4$, el cual es dependiente de la temperatura; en estado sólido es N₂O₄ puro, en estado líquido se produce una disociación parcial y arriba de 140 °C es un gas completamente disociado en NO₂. El N₂O₅ es muy inestable, gran parte de las reacciones en fase gaseosa dependen de la disociación en NO₂ y NO₃ reaccionando luego este último como agente oxidante. Es de notarse que en la mayoría de los casos el NO₂ resulta ser el producto final de las reacciones, es por esto que se considera como el único óxido de nitrógeno presente en la combustión del colágeno en las columnas y, por otro lado, no se puede descartar su aparición, ya que se traslapa con la CO₂.

Para poder comprender la disminución de la estabilidad térmica del colágeno, se requiere de un análisis más detallado. En este sentido, la espectroscopía infrarroja podría ser un pilar para el estudio del colágeno en presencia y ausencia de la fase mineral. Puesto que los intervalos de temperatura empleados resultaron muy grandes para poder interpretar correctamente el proceso de degradación y combustión con respecto a los procesos térmicos.

5.3 Aplicación de la Calorimetría de Barrido Diferencial al Estudio de Muestras Óseas Arqueológicas

Las curvas termoanalíticas de las muestras arqueológicas, presentan el mismo comportamiento que aquellas de huesos actuales. En algunos casos, principalmente de las muestras más antiguas, existe una disminución del segundo pico que aparece como un hombro, el cual no se presenta bien definido, mientras que en las más recientes si se llega a observar más claramente pero no con la misma intensidad que en los huesos actuales. Otra diferencia entre los mismos huesos arqueológicos es la intensidad (mW) de cada uno en sus respectivas curvas termoanalíticas, lo cual se refleja en los valores del área bajo la curva y es dependiente de la cantidad de materia orgánica, en este caso colágeno, que se conserva en su estructura.

La gráfica 26, muestra un estudio que se realizó en el laboratorio mediante difracción de rayos X, DRX, con muestras seleccionadas a partir de los resultados de Jang, 2000., con el fin de evitar las posibles variables que hubieran afectado su trabajo, aún así se encontraron muestras que tienden a salirse del patrón esperado de degradación. Al comparar la figura (25a) con la obtenida previamente en el laboratorio mediante difracción de Rayos X (Fig. 26) y la del análisis elemental (Fig. 27) se observa una clara similitud entre los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas. Las diferencias observadas, entre estas gráficas (en algunas muestras específicas) permite distinguir aquellos huesos arqueológicos que presentan algún tipo de sustitución que podría afectar la interpretación y por lo tanto, la curva ajustada en la figura (25a).

A partir de estos resultados, se observa una mayor pérdida de colágeno en los huesos de mayor antigüedad, mismo resultado que se obtuvo en la tesis de Jang, aunque también se observa claramente, que algunas muestras presentan una desviación muy grande con respecto a la curva obtenida, lo cual lleva a suponer que no tuvieron el mismo proceso de degradación que las demás muestras.

Otro aspecto importante que hay que mencionar, es el hecho de que Jang no emplea en su estudio todas las muestras que se analizaron en el presente trabajo, porque no las consideró adecuadas (las dos muestras de Tlatilco y Xochimilco ent. 9, ver tabla 2), mientras que otras (Xeambo y Bonampak) se salen del contexto arqueológico de la Cuenca del Valle de México. Aún así, en sus resultados encuentra también algunas discrepancias con respecto al modelo propuesto de degradación, en específico con las muestras de Xochimilco, San Pedro y San Pablo y San Jerónimo. Los resultados del presente trabajo muestran así mismo que algunas muestras arqueológicas estudiadas y no estudiadas por Jang, tienen discrepancias con respecto a la tendencia esperada del decaimiento exponencial que en teoría, presenta la pérdida de colágeno en huesos antiguos, bajo las mismas condiciones tafonómicas (o de enterramiento).

A partir de las curvas de ATG (fig. 30 y fig. 31) no se encuentra una relación del contenido de colágeno con la antigüedad, lo cual resulta coherente con los resultados de la calorimetría, ya que la intensidad y área de las curvas está en relación con la cantidad de colágeno de los distintos huesos.

En la figura (29) se observan todas las muestras analizadas y a partir de sus diferentes valores de entalpía y su respectiva antigüedad, se ajustaron tres curvas de decaimiento exponencial. Las curvas A y C se obtuvieron seleccionando un grupo de muestras que tuvieran un comportamiento característico que fuera distinto de las demás, mientras que la curva B se obtuvo empleando todas las muestras analizadas. Es importante mencionar que cada grupo de muestras de las cuales se ajustaron las curvas no pertenecían a un tipo de enterramiento ni a un sitio de enterramiento único. El hecho de ajustar distintas curvas responde a la idea de que determinadas muestras (aquellas mediante las cuales se ajustaron las curvas A y C) estuvieron sujetas al mismo esquema de degradación como consecuencia de las características fisicoquímicas (humedad, pH y temperatura ambiental principalmente) que en conjunto afectaron el tejido óseo, en especial al colágeno. Lo anterior ocasionó se obtuvieran valores de entalpía distintos y por ende distintos

comportamientos en la gráfica. Por otro lado, hay que considerar que se requiere un mayor número de muestras a analizar para poder ajustar las curvas que correspondan a distintas características de enterramiento, así mismo, es necesario evitar trabajar con muestras que presenten patologías y tener un amplio conocimiento de la química del suelo donde se encuentren las restos óseos.

Respecto a las gráficas obtenidas mediante difracción de Rayos X (fig. 26) y análisis elemental mediante técnicas nucleares (fig. 27) también se ajustaron curvas de decaimiento exponencial. En el caso de la difracción de Rayos X el índice IndRX se obtuvo a partir del cociente $I_{20}/I_{MAX} \times 100$, donde I_{MAX} es la intensidad más alta difractada por la muestra, y está asociada a la fase mineral, mientras que I_{20} es la intensidad al ángulo $2\theta = 20^\circ$ asociada a la fase orgánica (Heredia, 2000). En el análisis elemental se emplea el cociente de N/Ca, por lo que se relaciona la materia orgánica mediante N, con la inorgánica, Ca.

Se utilizó la siguiente ecuación de decaimiento exponencial para ajustar las distintas curvas:

$$y = Y_0 + A_1 \cdot e^{-t/\tau}$$

donde Y_0 es el valor que se obtiene cuando $t \rightarrow \infty$ y se interpreta como el valor de ΔH , IndRX o N/Ca (dependiendo de la técnica empleada) que se tendría a antigüedades extremadamente grandes; mientras que A_1 es el valor que se obtiene cuando $t = 0$ más el valor de Y_0 y se interpreta como el valor de ΔH , IndRX o N/Ca que se tienen en una muestra ósea actual. Tanto Y_0 como A_1 son condiciones de frontera en la curva ajustada para cada técnica. En la difracción de Rayos X el valor de Y_0 resulta diferente de cero (ver tabla 8) debido a que el índice IndRX se obtuvo a partir del cociente $I_{20}/I_{max} \times 100$ y ya que los valores de estas intensidades se ven afectados por diferentes factores (dispersión del aire, dispersión incoherente, etc.) no se logra obtener un valor del índice IndRX igual a cero para cuando no existe fase orgánica, es decir, colágeno en la muestra. Por esta razón se tomó como valor de $Y_0 = 6.45$, que resulta ser el menor valor del índice IndRX que se obtuvo en una muestra arqueológica.

Tabla 8. Condiciones de Frontera para cada curva ajustada.

	$Y_0 = y(t \rightarrow \infty)$	$A_1 = y(t = 0) + Y_0$
IndRX	6.45 ^a	15.03 ^b
ΔH (J/g)	0	2051.19
TGA (% masa)	0	23.08
N / Ca	0	0.64

^a IndRX de una muestra que presenta el índice más bajo.

^b IndRX de una muestra actual.

De la ecuación de decaimiento exponencial se obtiene el valor de Tau (τ), definido como el tiempo de vida media. En el presente trabajo se emplea τ de la misma forma en que se utiliza para obtener el valor del tiempo de vida media de isótopos radioactivos, por

ejemplo, el C^{14} presenta un valor de τ de 5730 años. Se obtiene teniendo en consideración que el exponente de la función e es el cociente $(-t / \tau)$ y cuando $\tau = t$, entonces se tiene e^{-1} que es igual a 0.3678..., este número indica la proporción de A_1 que queda cuando $Y_0 = 0$ y al ser evaluado sobre la curva de decaimiento exponencial se obtiene un valor específico de t el cual se define como tiempo de vida media, τ .

En la tabla 9 se presentan los valores del tiempo de vida media para las curvas ajustadas en los distintos métodos. Los valores de τ para las tres curvas de las muestras arqueológicas obtenidas mediante el calorímetro (Fig. 29) muestran una disminución del valor del tiempo de vida media. Un menor valor de τ implica que los factores ambientales (pH, humedad, temperatura, tipo de suelo) así como los factores estructurales del hueso (geometría del hueso, tipo de hueso- compacto o esponjoso) que influyen en la diagénesis del colágeno, tienen un mayor efecto sobre las muestras mediante las cuales se obtiene la curva, disminuyendo el tiempo que el colágeno se encuentra presente en la estructura del hueso.

Al comparar los valores de τ para Rayos X y el análisis elemental (Técnicas Nucleares) se observa que es mayor para esta última técnica. Debido a que en ambos casos se analizaron las mismas muestras, se puede afirmar, que el análisis elemental resulta ser una técnica más sensible para medir la presencia de materia orgánica, en este caso colágeno, con respecto a la materia inorgánica, hidroxapatita. Al observar el valor de τ_2 , que proviene de la curva B de la figura (29) la cual se obtuvo a partir de todas las muestras analizadas, se muestra que la calorimetría resulta una técnica mucho más sensible para medir materia orgánica en muestras antiguas, aunque a diferencia del análisis elemental no resulta específica, es decir, no se puede determinar si el valor de ΔH corresponde únicamente al colágeno.

Tabla 9. Valores del Tiempo de Vida Media.

M É T O D O			
Calorimetría *	Termogravimetría	Difracción de Rayos X	Técnicas Nucleares
$\tau_1 = 4492.27$	$\tau_{TGA} = 2321.29$	$\tau_{RX} = 589.80$	$\tau_{TN} = 998.91$
$\tau_2 = 1558.65$			
$\tau_3 = 845.53$			

* Los valores de τ_1 , τ_2 y τ_3 representan las curvas A, B y C de la figura 29.
 τ presenta unidades en años.

El fin de ajustar diferentes curvas que muestren distintos ritmos de degradación del colágeno es, el poder encontrar una relación entre dicho ritmo y las características químicas del suelo, y posteriormente, el poder predecir a partir de las características físicas del hueso, de sus valores de entalpía y de su antigüedad estimada dependiendo del estrato del cual proviene, las características de enterramiento y los factores que afectaron principalmente su estructura y provocaron su degradación. Sólo teniendo en claro lo anterior se podría predecir la antigüedad de un resto óseo mediante las técnicas utilizadas en el presente trabajo. Es importante mencionar que mientras se empleen técnicas que aporten diferentes datos en lo que se refiere a las características del colágeno y la relación entre la fase

orgánica e inorgánica, se tendrá una mejor estimación de la antigüedad de un resto, siendo que la diagénesis del tejido óseo es un proceso multifactorial.

5.4 Aplicación de la Calorimetría al Estudio de Muestras Óseas Paleontológicas.

En los termogramas, las muestras paleontológicas presentan un comportamiento completamente distinto al de los restos óseos arqueológicos y actuales como bien se observó en la figura 32, lo cual dificulta la interpretación de las señales. Es característico de estas muestras que la intensidad (en mW) es muy pequeña aun habiendo trabajado con trozos de los restos fósiles, lo cual es indicador de una muy pequeña fracción de fase orgánica. Debido a la forma de los termogramas resulta difícil aseverar que la totalidad de la señal corresponda al colágeno, siendo que durante el tiempo (millones de años) que estuvieron enterrados pudieron haber sufrido algún tipo de contaminación, por ejemplo la presencia de ácidos húmicos, que pueden provocar dichos cambios en la señal de las curvas termoanalíticas. Aun así el valor de la entalpía corresponde a la suma del área bajo la curva de todos los picos exotérmicos de cada termograma.

En el caso de las muestras de mamut, estas presentan predominantemente un pico exotérmico alrededor de los 350 °C, que se podría pensar corresponde al colágeno, pero la señal es distinta a la de los huesos arqueológicos. Cabe mencionar que en el laboratorio se han obtenido termogramas de huesos actuales de origen animal distintos al humano y su comportamiento es semejante a aquellos de las muestras óseas actuales, por lo que no cabe esperar una gran diferencia entre muestras óseas de diferentes organismos en lo referente a la calorimetría, como bien se observa en estas muestras de mamut.

En estas muestras paleontológicas resulta interesante obtener el valor de Tau (τ) el cual muestra un valor relativo del tiempo de vida media de una muestra específica. Se obtiene despejando τ de

$$\Delta H = Y_0 + \Delta H_0 \cdot e^{-t/\tau}$$

teniendo entonces

$$\tau = - \frac{t}{\ln \left(\frac{\Delta H}{\Delta H_0} \right)}$$

En la tabla 10 se observan los valores de τ calculados para las muestras paleontológicas. El tiempo de vida media varía dependiendo de la antigüedad de la muestra. Es importante mencionar que este valor de τ calculado se obtiene empleando un $\Delta H_0 = 2051.19$ (ver tabla 8), que es valor de A_1 que se obtuvo experimentalmente de las muestras arqueológicas, mientras que el ΔH corresponde al valor de entalpía de cada una de las muestras paleontológicas.

Tabla 10. Valores de τ calculados para las muestras paleontológicas.

MUESTRA	τ (años)	EDAD (años)
Hadrosaurio	25.48×10^6	73,000,000
Atún	4.32×10^6	15,000,000
Cetáceo Odontoceti	4.22×10^6	15,000,000
Cetáceo Mysticeti	5.64×10^6	15,000,000
Raya	5.67×10^6	15,000,000
Sirenio	5.87×10^6	15,000,000
Tiburón	3.03×10^6	9,000,000
Thalassoleon Mexicanus	2.64×10^6	9,000,000
Mastodonte	0.52×10^6	1,000,000
Mamut 1	3621.73	10,000
Mamut 2	3703.19	10,000
Mamut 3	5867.23	10,000
Mamut 4	4905.80	10,000

A partir de estos valores, se debe considerar que en el caso de las muestras arqueológicas se obtuvo un valor de τ de 1558.56 (ver tabla 9), muy por debajo de los valores de τ de las muestras paleontológicas, esto se puede deber a que en el caso de estas muestras, la curva de decaimiento exponencial no corresponde al ritmo de degradación que presentó el colágeno. Este razonamiento lleva a plantear el uso de otro tipo de curva, por ejemplo una curva sigmoideal, que represente de mejor forma cómo se va perdiendo el colágeno en estos huesos fósiles. La curva sigmoideal responde a la idea de que estos huesos estuvieron sujetos a unas condiciones iniciales que favorecieron la permanencia del colágeno y retardaron su pérdida en forma de un decaimiento exponencial. Para poder asegurar esto último, se requiere de información con respecto al ambiente en que estuvieron sujetas las muestras óseas, así como las características propias de los huesos. Otro aspecto que es importante considerar es la posibilidad de obtener valores de ΔH que no correspondan únicamente al colágeno, como ya se ha planteado para las muestras arqueológicas, debido a la presencia de contaminantes como la presencia de compuestos húmicos.

Finalmente en la figura (34) se ve el comportamiento global del valor de entalpía de todas las muestras óseas analizadas, si bien se puede observar una clara tendencia general a la disminución de la entalpía y por consiguiente al contenido de la fase orgánica, es obvio que se requiere analizar un mayor número de muestras para tener una tendencia más clara del comportamiento y poder ajustar una curva que represente dicha tendencia. Por otro lado, se debe considerar que las muestras paleontológicas se analizaron en trozo, por lo cual se debe tener cuidado al compararlas con las demás muestras. Cabe mencionar que la idea de ajustar diferentes curvas de decaimiento exponencial es aplicable a antigüedades de hasta unos cuantos miles de años, ya que para muestras de millones de años la proporción de fase orgánica que presentan es mínima y difícilmente se podrían distinguir distintos ritmos de pérdida de colágeno.

6. CONCLUSIONES

1. A partir de los termogramas del calorímetro, se encontró que el colágeno presente en los huesos actuales tiene una menor estabilidad térmica en comparación con las del colágeno extraído mediante diferentes métodos de los mismos huesos actuales. Esto se puede atribuir a un efecto del cristal sobre la proteína.
2. Los valores de ΔH de combustión de los huesos actuales obtenidos a partir de los procesos exotérmicos resultaron semejantes y reproducibles. Así mismo los valores de ΔH de las muestras de colágeno son similares a aquellos de las muestras óseas actuales, lo cual sustenta la hipótesis que la disminución de la estabilidad térmica del colágeno se ocasiona por efecto de la presencia del cristal en el hueso. Además, sugiere que durante el proceso de mineralización no se afecta en gran medida al colágeno en lo que respecta a los entrecruzamientos que se tienen entre las moléculas.
3. Mediante el uso de la espectroscopía infrarroja, se observó que los valores de transmitancia muestran en ambos casos, una disminución gradual y diferente para las distintas bandas que le fueron asignadas al colágeno, esta disminución es una clara señal de las diferentes energías de enlace. Esto último, mediante un análisis más detallado, podría ser relacionado con la estabilidad térmica en presencia y ausencia del cristal.
4. Respecto a las muestras arqueológicas, se observó una mayor pérdida de colágeno con la antigüedad, aunque al mismo tiempo se observa claramente que algunas muestras presentan una desviación muy grande con respecto a la curva ajustada, lo cual lleva a suponer que no tuvieron el mismo proceso de degradación que las demás muestras.
5. A partir de los diferentes valores de entalpía de las muestras arqueológicas y su respectiva antigüedad se ajustaron diferentes curvas de decaimiento exponencial. Así mismo se obtuvo el valor de Tau (τ), el cual está definido como el tiempo de vida media, para el colágeno presente en hueso. Los valores de τ para las tres curvas de las muestras arqueológicas obtenidas mediante el calorímetro muestran una disminución del valor del tiempo de vida media, lo cual como se mencionó, se puede deber a la acción de los factores externos que provocan diferentes ritmos de pérdida de colágeno.
6. En las muestras paleontológicas, se encontró que éstas muestran un comportamiento completamente distinto al de las muestras actuales y arqueológicas. Lo anterior dificulta su interpretación debido a que no se puede aseverar que la totalidad de la señal corresponda al colágeno, existiendo la posibilidad de que pudieran haber sufrido alguna contaminación.
7. Se obtuvieron valores de τ para las muestras paleontológicas, concluyendo que la curva de decaimiento exponencial no corresponde al ritmo de degradación que presentó el colágeno en las muestras arqueológicas. Debido a esto, se plantea la posibilidad de ajustar una curva sigmoideal, que represente de mejor forma cómo se va perdiendo el colágeno en estos huesos fósiles.

8. Finalmente se encontró que la calorimetría resulta ser una técnica muy sensible para medir materia orgánica en muestras antiguas, pero no resulta específica, es decir, no se puede determinar si el valor de ΔH corresponde únicamente al colágeno.

REFERENCIAS.

- Andrews, P. 1995. Experiments in taphonomy. *J. Archaeo. Sci.* 22, 147-153.
- Balmain, J., Hannover, B. y E. López. 1999. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction analyses of mineral and organic matrix during heating of mother of pearl (nacre) from the shell of the mollusc *Pinctada maxima*. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 48, pp 749-754.
- Baraldi, P., Beltrami, C., Cassai, C., Molinari, L. y R. Zunarelli. 1998. Measurements of combustion enthalpy of solids by DSC. *Materials Chemistry and Physics* 53, pp. 252-255.
- Bartsiokas, A. and A. Middleton. 1992. Characterization and dating of recent and fossil bone by X-ray diffraction. *J. Archaeo. Sci.*, 19, 63-72.
- Beck, K. and J. Brodsky. 1998. Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the α -helical coiled coil. *J. Struct. Biol.* 122, 17-29.
- Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B. and H. Berman. 1994. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 resolution. *Science*, Vol. 266, pp. 75-81.
- Bigi, A. et al. 1997. Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. *J. Inorg. Biochem.* pp. 45-51.
- Bretscher, L., Jenkins, C., Taylor, K., DeRider, M. and R. Raines. 2001. Conformational stability of collagen relies on a stereoelectronic effect. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 777-778.
- Brown, W.E., Smith, J.P., Lehr, J.R. y Frasier, A.W. 1962. Octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature*, Vol 196, N.4859, Dic 15.
- Camacho, N., West, P., Torzilli, P. and Mendelsohn, R. 2000. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. *Biopolymers*, Vol. 62, No. 1, pp 1-8.
- Camacho, N., Rinnerthaler, S., Paschalis, E., Mendelsohn, R., Boskey, A. and P. Fratzl. 1999. Complementary information on bone ultrastructure from scanning small angle X-ray scattering and fourier-transform infrared microspectroscopy. *Bone*, vol 25, No 3, pp 287-293.
- Casella, J.P., Pereira, R., Khillan, J. S., Prockop, D.J., Garrington, N., and S.Y. Ali. 1994. An ultrastructural, microanalytical, and spectroscopic study of bone from a transgenic mouse with a COL1A1 Pro-Alpha-1 mutation. *Bone*, vol 15, No 6, pp 611-619.
- Cattaneo, C., Gelsthorpe, K., Phillips, P. and R. J. Sokol. 1995. Differential survival of albumin in ancient bone. *J. Archaeo. Sci.* 22, 271-276.
- Child, A. 1995. Towards an understanding of the microbial decomposition of archaeological bone in the burial environment. *J. Archaeo. Sci.* 22, 165-174.
- Collins, M., Riley, M., Child, A. and G. Turner-Walker. 1995. A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen. *J. Archaeo. Sci.* 22, 175-183.
- Crick, F.H.C. 1953. The packing of alpha-helices: simple coiled-coils. *Acta Cris.* 6, 689.
- Evershed, R., Turner-Walker, G., Hedges, R., Tuross, N. And A. Leyden. 1995. Preliminary results for the analysis of lipids in ancient bone. *J. Archaeo. Sci.* 22, 277-290.
- Fang, Y., Agrawal, D. K. and D. M. Roy. 1994. Thermal stability of synthetic hydroxyapatite. In: *Hydroxyapatite and related materials*. CRC Press.
- Fessas, D. et al. 2000. Calorimetric, biochemical and morphological investigations to validate a restoration method of fire injured ancient parchment. *Thermochim. Acta* 348, pp. 129-137.
- Grupe, G. 1995. Preservation of collagen in bone from dry, sandy soil. *J. Archaeo. Sci.* 22, 193-199.
- Hedges, E. M. and C. Wallace. 1980. The survival of protein in bone. In: *Biogeochemistry of amino acids*. 1st edn. USA: John Wiley and Sons.
- Hedges, E. M. and A. Millard. 1995. Bones and groundwater: Towards the modelling of diagenetic processes. *J. Archaeo. Sci.* 22, 155-164.
- Hedges, E. M. and A. Millard. 1995. Measurements and relationships of diagenetic alteration of bone from three archaeological sites. *J. Archaeo. Sci.* 22, 201-209.
- Heredia, A. 2000. "Estudio de huesos antiguos y modernos: Morfología, estructura y aportaciones al estudio de biomateriales". UNAM. Facultad de Ciencias. Tesis. Dir.: Dr. Lauro Bucio.
- Holmgren, S., Taylor, K., Bretscher, L. and R. Raines. 1998. Code for collagen's stability deciphered. *Nature*, 392, 666-667.
- Jang Cho, H. "El método de fechamiento por colágeno residual aplicado en 7 sitios arqueológicos de la cuenca de México", Facultad de Filosofía y Letras, División de Estudios de Posgrado, UNAM, México, 2000. Tesis.

- Jinan, Cao. 1999. Melting study of the alfa-form crystallites in human hair keratin by DSC. *Thermochimica Acta*, 335 pp. 5-9.
- Johnsson, K. 1997. Chemical dating of bones based on diagenetic changes in bone apatite. *J. Archaeol. Sci.*, 24, 431-437.
- Kaflak-Hachulska, A. y W. Kolodziejski. 1999. Preliminary results on infrared microscopy of human bone. *J. Molec. Struct.* 511-512, pp. 217-221.
- Kato, Y., Uchida, K. and S. Kawakishi. 1992. Oxidative fragmentation of collagen and prolyl peptide by Cu(II)/H₂O₂. Conversion of proline residue to 2-pyrrolidone. *J. Biol. Chem.* 267, 23646-23651
- Katzenberg, M. and R. Harrison. 1997. What's in a bone? Recent advances in archaeological bone chemistry. *J. Archaeol. Res. Vol. 5, No. 3*, pp. 265-293.
- Komsa-Penkova, R., Koynova, R., Kostov, G. and B. Tenchov. 1999. Discrete reduction of type I collagen thermal stability upon oxidation. *Biophys. Chem.* 83, 185-195.
- Kronick, P. and P. Cooke. 1996. Thermal stabilization of collagen fibers by calcification. *Conn. Tissue Res.* 33, 275-282.
- LeGeros, R. 1965. *Nature.*, 206, 403-404.
- LeGeros, R., Trautz, O.R., LeGeros, J.P., and Klein, E. 1967. *Science*, 155, 1409¹41.
- Liao, C., Lin, F., Chen, K. and J. Sun. 1999. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials* 20, 1807-1813.
- Lin, F. et al. 2000. Thermal reconstruction behavior of the quenched hydroxyapatite powder during reheating in air. *Materials Science and Engineering C*, 13, pp. 97-104.
- Lorinczy, D., Koneczol, F., Gaszner, B. y J. Belagyi. 1998. Structural stability of actin filaments as studied by DSC and EPR. *Termochim. Acta* 322, pp. 95-100.
- Lowenstein, J. 1980. Immunospecificity of fossil collagens. In: *Biogeochemistry of amino acids*. 1^o edn. USA: John Wiley and Sons.
- Mangrich, A., Lobo, M., Tanek, C., Wypych, F., Toledo, E., y Guimaraes, E., 2000. Criterious preparation and characterization of earthworm-composts in view of animal waste recycling. Part I. Correlation between chemical, thermal and FTIR spectroscopic analyses of four humic acids from earthworm-composted animal manure. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 11, No. 2, pp. 164-169.
- Mayer, I., Cohen, H., Voegel, J., and F. Cuisinier. 1997. Synthesis, characterization and high temperature analysis of Al-containing hydroxyapatites. *Journal of Crystal Growth* 172, 219-225.
- Michel, V., Falgueres, C. and J. Dolo. 1998. ESR signal behavior study at G~2.002 of modern and fossil bones for heating palaeotemperature assessment. *Radiation Measurements*, vol. 29, No. 1, pp. 95-103.
- Michel, V., Ildefonse, P., y Morin, G. 1996. Assessment of archeological bone and dentine preservation from Lazzaret cave (Middle Pleistocene) in France. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 126, pp. 109-119.
- Middaugh, C., Mach, H., Ryan, J., Sanyal, G and D. Volkin. Chapter 6: Infrared Spectroscopy. In: *Protein Stability and Folding*. Ed. Bret A. Shirley. Humana Press. New Jersey. 1995. Pp 137-156.
- Miles, C. A., Burjanadze, T. and A. Bailey. 1995. The kinetics of the thermal denaturation of collagen in unrestrained rat tail tendon determined by differential scanning calorimetry. *J. Mol. Biol.* 245, 437-446.
- Miles, C., y Ghelashvili, M. 1999. Polymer-in-a-box mechanism of the thermal stabilization of collagen molecules in fibers. *Biophysical Journal* Vol. 76, pp. 2343-3252.
- Miles, C. A., Knott, L., Sumner, I. G. and A. Bailey. 1998. Differences between the thermal stabilities of the three triple-helical domains of the type IX collagen. *J. Mol. Biol.* 277, 135-144.
- Nancy P. Camacho, N., West, P., Torzilli, P. and R. Mendelsohn. 2001. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. *Biopolymers*, Vol. 62, No. 1, 1-8.
- Newesley, H. 1989. Fossil bone apatite. *Applied Geochemistry*, Vol. 4, pp. 233-245.
- Nielsen-Marsh, C., Hedges, R., Mann, T. and M. Collins. 2000. A preliminary investigation of the application of differential scanning calorimetry to the study of collagen degradation in archaeological bone. *Thermochim. Acta*, 365, 129-139.
- Parsche, F. and A. Nerlich. 1997. Suitability of immunohistochemistry for the determination of collagen stability in historic bone tissue. *J. Archaeol. Sci.* 24, 275-281.
- Pauling, L. 1970. In: *General Chemistry*, 1^o edn. New York: Dover.

- Persikov, A., Ramshaw, J., Kirkpatrick A, and B. Brodsky. 2000. Amino acid propensities for the collagen triple-helix. *Biochem.* 39, 14960-14967.
- Peters, F., Schwarz, K. and M. Epple. 2000. The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis. *Thermochemica Acta* 361, 131-138.
- Piepenbrink, H. 1989. Examples of chemical changes during fossilisation. *Applied Geochemistry*, Vol. 4, pp. 273-280.
- Pleshko, N., Boskey, A. and R. Mendelson. 1991. Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. *Biophys. J.* Vol. 60, No. 4, pp. 786-793.
- Prockop, D. and A. Fertala. 1998. The collagen fibril: the almost crystalline structure. *J. Struct. Biol.* 122, 111-118.
- Rhee, S. y J. D. Lee. 2000. Nucleation of hydroxyapatite crystals through chemical interaction with collagen. *J. Am. Chem. Soc.* 83 (11), pp. 2890-2892.
- Rochdi, A., Foucat, L. and J. Renou. 2000. NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen. *Food Chem.* 69, 295-299.
- Rosser, J. And B. de Crombrughe. 1996. Type I collagen: Structure, synthesis, and regulation. In: *Principles of bone biology*. Ed. Bilezikian, J. 1st edn. USA: Academic Press.
- Rudokova, T. and G. Zaikov. 1987. Degradation of collagen and its possible applications in medicine. *Poly. Degrad. Stab.* 18, 271-291.
- Sakae, T., Mishima, H., Kozawa, Y. and R. Z. LeGeros. 1995. Thermal stability of mineralized and demineralized dentin: A differential scanning calorimetric study. *Conn. Tissue Res.* 33, 193-196 [515-518].
- Schoeninger, M., Moore, K., Murray, M. and J. Kingston. 1989. Detection of bone preservation in archaeological and fossil samples. *Applied Geochemistry*, Vol. 4, pp. 281-292
- Sicot, F. et. al. 2000. Molecular adaptation to an extreme environment: origin of the thermal stability of the Pompeii worm collagen. *J. Mol. Biol.* 301, pp. 811-820.
- Stiner, M., Kuhn, S., Weiner, S. and O. Bar-Yosef. 1995. Differential burning, recrystallization, and fragmentation of archaeological bone. *J. Archaeo. Sci.* 22, 233-237.
- Stuart-Williams, H., et. al. 1996. The isotopic composition and diagenesis of human bone from Teotihuacan and Oaxaca, Mexico. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 126 pp. 1-14.
- Suetsugu, Y., & Tanaka, J. 1999. Crystal growth of carbonate apatite using a CaCO₃ flux. *Journ. Mater. Sci: mat in med.* 10 561-566.
- Torikai, A. y H. Shibata. 1999. Effect of ultraviolet radiation on photodegradation of collagen. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 73, pp.1259-1265.
- Turner-Walker, G. and T. V. Parry. 1995. The tensile strength of archaeological bone. *J. Archaeo. Sci.* 22, 185-191.
- Tuross, N., Eyre, D., Holtrop, M., Glimcher, M. and P. Hare. 1980. Collagen in fossil bones. In: *Biogeochemistry of amino acids*. 1st edn. USA: John Wiley and Sons.
- Usha, R. and T. Ramasami. 1999. Influence of hydrogen bond, hydrophobic and electrovalent salt linkages on the transition temperature, enthalpy and activation energy in rat tail tendon (RTT) collagen fibre. *Thermochem. Acta.* 338, 17-25.
- Van Klinken, G. and E. M. Hedges. 1995. Experiments on collagen-humic interactions: Speed of humic uptake, and effects of diverse chemical treatments. *J. Archaeo. Sci.* 22, 263-270.
- Wess, T. and J. Orgel. 2000. Changes in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration. *Thermochem. Acta.* 365, 119-128.
- Wiener, S. and W. Traub. 1986. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS* 4049, Vol.206, No. 2, 262-266.
- Wiener, S. and W. Traub. 1991. Organization of crystals in bone. In *Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems* (eds. S. Suga and H. Nakahara), pp. 247-253.
- Winter, F., Wartha, C. y H. Hofbauer. 1999. NO and N₂O formation during the combustion of wood, straw, malt waste and peat. *Bioresource Technology* 70 pp. 39-49.
- Wu Yang, X., et. al. 1999. Determination of combustion energies of thirteen amino acids. *Thermochemica Acta* 329 pp. 109-115.

Wyckoff, R. 1980. Collagen in fossil bones. In: Biogeochemistry of amino acids. 1st edn. USA: John Wiley and Sons.

Zhou, J., Zhang, X., Chen, J., Zeng, S. and K. De Groot. 1993. High temperature characteristics of synthetic hydroxyapatite. J. Mater. Sci. Mater. Med. 4, 83-85.

APÉNDICE I

Como se mencionó anteriormente, la forma que presenta el termograma es dependiente del tratamiento de la muestra. Cuando se introduce un trozo de hueso en el módulo del calorímetro, en el termograma se presentan dos picos exotérmicos fácilmente distinguibles, el primero a ~ 355 °C y el segundo a ~ 455 °C (fig. 35a), dando inicio la transición a 200 °C y terminando a 550 °C aproximadamente. Así mismo se observa que el pico endotérmico se alarga hasta los 150 °C siendo esto un efecto retardado de la salida de agua fisiabsorbida. La presencia de un segundo pico exotérmico se va incrementando con el tamaño de trozo llegando a un punto donde la masa del trozo de hueso es tal que se origina prácticamente un solo pico que enmascara a los dos picos iniciales (fig. 35b). Esto es debido a que la transmisión de calor es distinta cuando el trozo es más grande, lo que ocasiona que el colágeno del centro del trozo tarde más en degradarse, cuando la muestra se muele y tamiza el segundo pico se transforma en un hombro como se muestra en los resultados (fig. 6a y 6b). Es importante hacer notar esto, ya que dependiendo de la forma en que se estudie la muestra se obtiene un termograma distinto.

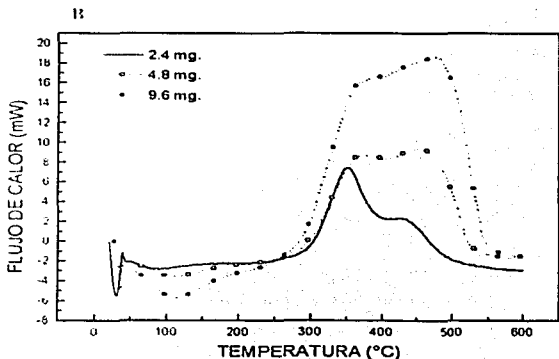
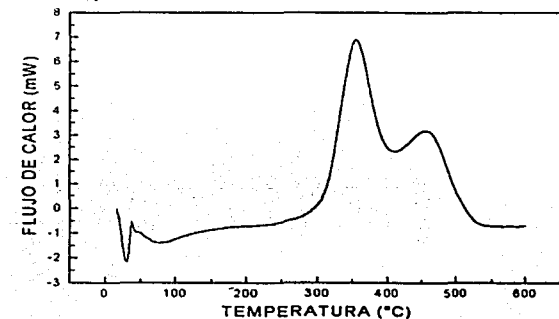


Fig. 35. Efecto del tratamiento de la muestra sobre la curva termoanalítica. A) Termograma de un trozo de hueso actual. B) Comparación de los termogramas de trozos del mismo hueso actual de diferente masa.

APENDICE II

La mayoría de los análisis térmicos sobre colágeno, se enfocan a la desnaturalización de la proteína y reportan que la T_{max} de dicho fenómeno se encuentra alrededor de los 60°C . Así, se investigó la presencia de dicho proceso en la colágena de hueso en polvo. La presencia del cristal de hidroxiapatita, puede afectar al proceso de degradación y combustión de la proteína, bien podría tener alguna influencia sobre la desnaturalización. En la Fig. (36) se observa el efecto de un exceso de agua en la muestra en polvo a diferencia de la muestra seca, apareciendo un pico endotérmico muy pronunciado con una T_{max} a 60°C . En la fig. (36) se observa que los picos exotérmicos se encuentran recorridos hacia la izquierda teniendo su T_{max} en 300 y 370°C respectivamente debido al cambio de ritmo de calentamiento de $1^{\circ}\text{C} \times \text{min}$. A partir de estos resultados no se puede asegurar que el pico endotérmico represente la desnaturalización del colágeno ya que la curva del agua destilada presenta las mismas características. El colágeno del hueso es poco soluble debido las interacciones que presenta y al tamaño de la molécula, por lo que se puede afirmar que antes del proceso de degradación y combustión que surge después de los 220°C la proteína sólo presenta una deshidratación que no afecta a su estructura, es decir, la triple hélice se mantiene presente. Este fenómeno es de importancia cuando se estudia el colágeno presente en huesos antiguos ya que podría cambiar su estabilidad térmica durante la combustión.

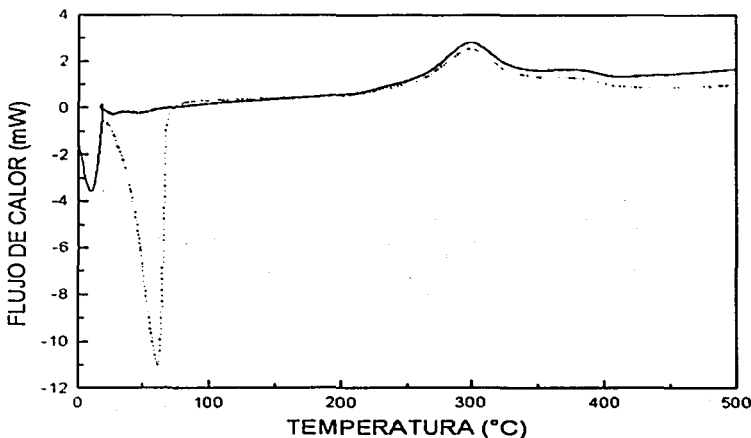


Fig. 36. Efecto del exceso de agua en una muestra en polvo de un hueso actual.

APÉNDICE III

Con la muestra de colágeno Sigma se estudió el efecto de molienda sobre la proteína, ya que se ha reportado que la fricción que producen las bolas de ágata afecta la estabilidad térmica de las proteínas (Nielsen, et al. 2000). En la figura (37) se puede observar que el efecto de molienda de 1 hora de duración afecta considerablemente al colágeno, al compararla con la figura del recuadro superior derecho (figura 17). Presenta principalmente tres picos exotérmicos variando la posición y la intensidad de los mismos, el primero a 250 °C es más fino e intenso; el segundo a 350 °C tiene el mismo valor de T_{max} que el segundo pico del colágeno sin moler pero presenta una mayor intensidad, mientras que el tercer pico prácticamente desaparece al compararlo con el del colágeno sin moler. Estas diferencias muestran que el efecto de molienda puede afectar al colágeno presente en hueso, pero como anteriormente se ha mencionado, el trabajar con la muestra en polvo permite efectuar un mayor número de análisis necesarios para la correcta interpretación del proceso de degradación y combustión. Por otro lado es importante mencionar que el tiempo de molienda para el caso de las muestras en polvo se encuentra alrededor de 10 a 15 minutos ya que la presencia del cristal favorece su rápida fragmentación.

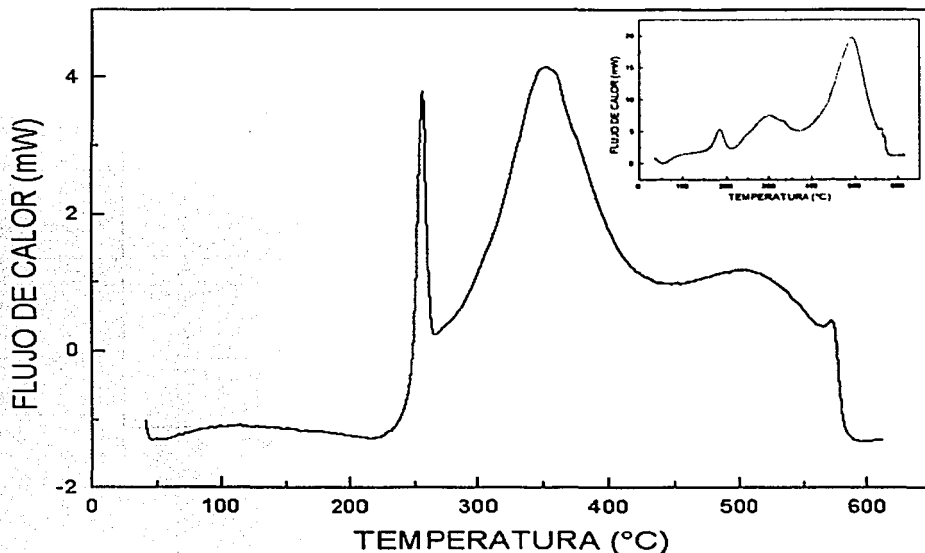


Fig. 37. Efecto del proceso de molienda sobre el colágeno Sigma.

APÉNDICE IV

La proteína requiere obligatoriamente la presencia de oxígeno para poder oxidarse completamente, al ser expuesta a una atmósfera inerte de argón se observa una curva como la de la Fig. (38a), que presenta 3 picos endotérmicos, el primero correspondiente a la deshidratación a 50 °C, los siguientes a 350 y 500 °C, en el primer caso se corresponde perfectamente con la T_{max} de la exoterma del proceso de combustión. En la Fig. (38b) se observa una muestra vuelta a correr en una atmósfera de aire después de haber sido corrida en una atmósfera de helio donde se encuentra ausente el oxígeno, se tiene entonces un sólo pico exotérmico a 400 °C.

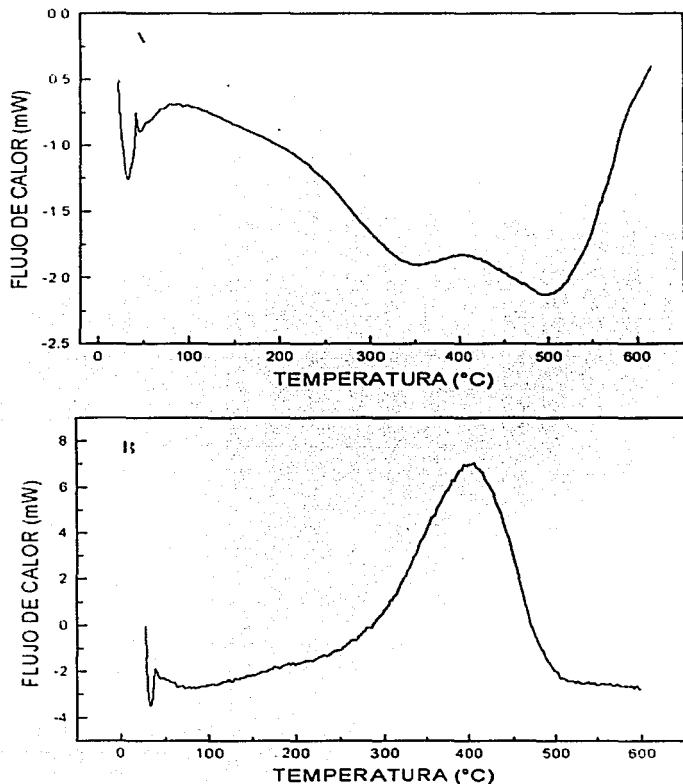


Fig. 38. Se muestran los termogramas para el caso de A) una corrida de muestra ósea actual con atmósfera inerte de argón y B) otra muestra ósea actual corrida con atmósfera de oxígeno después de haber sido corrida con una atmósfera de helio.