

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE QUÍMICA

"APLICACIONES FORENSES DEL¹⁴C: DETERMINACIÓN POST-MORTEM DE LAS FECHAS APROXIMADAS DE NACIMIENTO Y MUERTE"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ROBERTO LÓPEZ MARTÍNEZ



Ciudad de México

2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Dr. Juan Manuel Rodríguez
VOCAL:	M. en I. Pedro Salvador Valadez Eslava
SECRETARIO:	Dr. Miguel Ángel Martínez Carrillo
1er. SUPLENTE:	DRA. Brenda Lizette Ruiz Herrera
2° SUPLENTE:	M. en C. José Mojica Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

 TALLER DE FÍSICA DE RADIACIONES 2

INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

LABORATORIO NACIONAL DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON ACELERADORES

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Miguel Ángel Martínez Carrillo

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Corina Solís Rosales

SUSTENTANTE (S):

Roberto López Martínez

Agradecimientos

Debo reconocer el apoyo otorgado por todos aquellos que directa o indirectamente participaron en la elaboración de esta tesis. Agradezco a:

La Dra. María Esther Ortiz y Salazar y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo otorgado a través de la beca de ayudante de investigador.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo a través del Proyecto CONACyT 280769

La Dirección de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo otorgado a través del Proyecto DGAPA IG100216

A la Facultad de Ciencias y al Instituto de Física de la UNAM por el apoyo y facilidades que me proporcionaron.

Índice

1.	Introducción	1
2.	Antecedentes	2
1.	Carbono	2
	1. Cosmogénesis del carbono	2
	2. Propiedades y formas alotrópicas	3
	3. El carbono en la naturaleza	8
2.	El ¹⁴ C	11
	1. Descubrimiento	11
	2. Formación	12
	3. Métodos de detección de ¹⁴ C	13
	4. Pico de la bomba	17
	5. Datación con ¹⁴ C con el pico de la bomba	21
	6. Fraccionamiento isotópico	21
	7. Normalización	23
	8. Materiales estándar	24
	9. Edad ¹⁴ C y edad calendario	26
	10. Análisis de ¹⁴ C por EMA	27
3.	Estructura y bioquímica dental	34
	1. Estructura y tiempos de formación de dientes	34
	2. Composición química del esmalte	36
	3. Composición química de la dentina	38
4.	Aplicaciones forenses del ¹⁴ C	41
	1. Generalidades	41
	2. Determinación del tiempo de vida a través	
	del contenido de ¹⁴ C en dientes	42
5.	Contexto social sobre análisis de restos quemados	44
	1. Accidentes	44
	2. Identificación de restos	45
3.	Pregunta de investigación y objetivos	47
4.	Materiales y métodos	48
5.	Resultados y discusión	55
6.	Conclusiones	70
7.	Apéndice	71
8.	Referencias	75

Índice de figuras

1.	Proceso de fusión del helio en gigantes rojas	3
2.	Diamante y grafito	5
3.	Estructuras de los fulerenos	5
4.	Ilustración de la estructura de algunas formas de nanotubos	6
5.	Diagrama del ciclo del carbono	7
6.	Producción y distribución del ¹⁴ C	12
7.	Grafico utilizado por Willard F. Libby para calcular la vida media del ¹⁴ C	14
8.	Principio de detección de emisión beta por centelleo líquido	16
9.	Nube con forma de hongo	18
10	Pico de la bomba	20
11.	Fundamento de la espectrometría de masas	28
12	Etapas características en un sistema de medición por EMA asociado a un acelerador tándem	30
10.	Odentegrome	25
14.	Esqueme de les portes que componen a una pieza dental	25
10.	Esquerna de las partes que componen a una pieza dental	<u> </u>
10.		30
17.	Diagrama de fluie para el pretratemiente y grefitización de carbonates	40 50
10.	Diagrama de ilujo para el pretratamiento y grantización de carbonatos	53
19.	Proceso de grafilización en el software proporcionado por IONPlus	57
20.	Intervalo calibrado de la muestra 831	61
21.	Intervalo calibrado de la muestra 832	61
22.	Intervalo calibrado de la muestra 833	61
23.	Intervalo calibrado de la muestra 834	61
24.	Intervalo calibrado de la muestra 835	61
25.	Intervalo calibrado de la muestra 836	61
26	Intervalo calibrado de la muestra 837	61
27	Intervalo calibrado de la muestra 838	61
28	Intervalo calibrado de la muestra 839	61

Índice de tablas

1.	Cronología de formación y erupción dentaria	36
2.	Registro de las piezas dentales con clave asignada en el LEMA	48
3.	Diseño experimental para cada pieza dental	49
4.	Dientes calcinados a diferentes temperaturas	<u>58</u>
5.	Resultados de la concentración de ¹⁴ C dada en Fm	<u>59</u>
6.	Tabla de datos para ANOVA	59
7.	Tabla ANOVA	59
8.	Intervalos de tiempo calibrados	62
9.	Fechas de nacimiento real y fechas calibradas	63
10. Comparación entre la edad real y el intervalo de tiempo		
	con mayor probabilidad	64
11. Intervalo de tiempo que debe considerarse de acuerdo al tipo		
	de diente	64
12	. Ajuste de la edad calibrada	65

Índice de fotografías

1.	Horno eléctrico cilíndrico	49
2.	Equipo automatizado para la hidrólisis de carbonatos CHS lonPlus	52
3.	Equipo automatizado de grafitización AGE III IonPlus	52
4.	Tubos de plástico con una dental cada uno	57

1. Introducción

Durante los últimos años la ciencia se ha utilizado para apoyar en investigaciones jurídicas. Las ciencias forenses son un conjunto de conocimientos de carácter científico y jurídico que se complementan y coadyuvan en la procuración y administración de la justicia.

El aumento de delitos que involucran la desaparición de personas ha provocado el interés por analizar los restos encontrados en una escena criminal. De la misma manera, en un accidente, sea de tráfico, aéreo o desastre natural que involucre fuego deja pocas posibilidades de reconocer a los afectados.

Uno de los tejidos mineralizados más duros y resistentes en el cuerpo humano son los dientes, estos están compuestos por colágeno y bioapatita. La bioapatita es un mineral muy parecido a la hidroxiapatita, un mineral de fosfato muy duro, refractario, con punto de fusión mayor a 1600°C y estable a pH básico. La bioapatita contiene en su estructura carbonatos. Los cuales también se encuentran adsorbidos en la estructura cristalina.

El isótopo de ¹⁴C por su baja abundancia y su vida media bien conocida, ha servido para determinar la edad de piezas arqueológicas. El aumento en la concentración del ¹⁴C en los años 50 y 60, debida a la detonación de bombas nucleares, se ha marcado los tejidos de todos los seres vivos que nacieron entre 1950 y 1990.

La técnica de Espectrometría de Masas con Aceleradores (EMA) permite conocer la cantidad de ¹⁴C en muestras muy pequeñas. Permite datar muestras antiguas o modernas comparándolas con las curvas de calibración de concentración de ¹⁴C adecuadas.

En este trabajo se reproducirá la fecha de nacimiento de algunas personas utilizando esmalte dental. Las muestras se sometieron a diferentes temperaturas simulando un contexto forense donde hubo fuego. Se probaron distintas temperaturas para determinar el límite en el que se obtienen resultados confiables. Se utilizó la técnica de EMA para encontrar la concentración de ¹⁴C y calibrarla con la curva de calibración del pico de la bomba.

2. Antecedentes

1. Carbono

1. Cosmogénesis del carbono

Los primeros átomos en formarse en el Universo tras el Big Bang, fueron los del isótopo del hidrógeno: deuterio. Pero, las condiciones de temperatura y radiación tan altas, prevalecientes en el Universo en ese momento, no favorecían la existencia de este núcleo. Al enfriarse el Universo, propició la fusión de núcleos ligeros que dieron origen a núcleos más pesados. De ahí que los primeros átomos en formarse fueron los de deuterio, tritio, ³He, ⁴He, ⁷Be y ⁷Li [1]. Los núcleos con masa 5 y 8, menos estables bajo estas condiciones, no se formaron. De acuerdo con las hipótesis más aceptadas, cuando la temperatura fue lo suficientemente baja (4x10⁸) K) la repulsión entre los núcleos de mayor carga eléctrica fue mayor que la energía térmica de los mismos, impidiendo la creación de los núcleos más grandes. Se cree que, varios cientos de millones de años después del Big Bang, no se crearon núcleos nuevos, favoreciendo la formación de las primeras estrellas a partir de cúmulos de esa materia primigenia por atracción gravitacional. Las altas presiones y temperaturas en los centros de las estrellas, provocaron que los electrones se disociaran de los núcleos para formar plasma, que aunado a las altas presiones y temperaturas favoreció la nucleosíntesis estelar de átomos de helio a partir de cuatro protones con un gran desprendimiento de energía.

Cuando se agota el hidrogeno en el centro de una estrella, la fusión nuclear cesa y la disminución de la temperatura inhibe la expansión. Se provoca una contracción gravitacional del núcleo estelar, con el consecuente aumento de temperatura, que calienta las capas estelares externas, ricas en hidrógeno, lo suficiente como para reiniciar la nucleosíntesis de helio. Este nuevo proceso de fusión genera una expansión de las capas externas de la estrella, origen de las estrellas gigantes rojas. La fusión de hidrógeno en las capas intermedias produce más helio, que es atraído gravitacionalmente hacia el centro, lo que genera un aumento de presión y temperatura. Cuando la temperatura del centro alcanza los 10⁸ K los núcleos de helio tienen suficiente energía cinética para vencer la repulsión electrostática entre ellos y se fusionan para formar ¹²C, en un proceso que consiste en la fusión de dos núcleos de helio para formar ⁸Be (inestable), que posteriormente se fusiona con



Figura 1. Proceso de fusión del helio en gigantes rojas. Tomado de [1].

otro núcleo de helio para dar lugar a los átomos de ¹²C [1] (Figura 1), un elemento estable y por lo mismo, el tercero más abundante en el Universo.

2. Propiedades y formas alotrópicas

La Química orgánica es la rama de la Química que se encarga de estudiar los del carbono reacciones. Existe compuestos ۷ sus una amplia gama de moléculas que contienen carbono en su estructura, desde las formas alotrópicas del carbono, formadas por redes covalentes y estructuras moleculares, ampliamente utilizados en ciencia e ingeniería de materiales, hasta las complejas moléculas esenciales para la vida: los carbohidratos, las proteínas, los lípidos, las vitaminas y los ácidos nucléicos. Todos ellos originados gracias a la característica más notable del carbono: la concatenación o capacidad para enlazarse químicamente consigo mismo, formando cadenas, anillos y estructuras complejas muy estables.

Dos de los alótropos más conocidos del carbono en los que la concatenación da lugar a redes covalentes son el grafito y el diamante. La estructura de ambos depende de la hibridación de los orbitales atómicos de los átomos de carbono que los constituyen. La red covalente del diamante, una de las sustancias naturales más dura conocidas (10 en la escala de dureza Mohs), se describe adecuadamente a través de un modelo de hibridación sp³, en la que cada átomo de carbono se enlaza con otros cuatro en una red tetraédrica (Figura 2). El diamante se puede transformar en grafito bajo condiciones de temperatura de más de 1500° C al vacío o en atmosfera inerte [2].

Por otra parte, la red covalente del grafito es bidimensional y se describe con un modelo de hibridación sp² en la que cada átomo de carbono se une a otros tres a través de un enlace covalente tipo σ . El cuarto orbital no hibridizado forma un orbital deslocalizado que forma una segunda unión química de tipo π . La estructura bidimensional resultante está formada por hexágonos planos. El grafito sólido se forma por la superposición de un gran número de capas bidimensionales formadas por hexágonos (también llamadas hojas de grafeno), entre las cuales no hay una unión química como tal, sino que se encuentran unidas a través de interacciones intermoleculares: fuerzas de van der Waals, que mantienen unidas las capas de grafeno a una distancia de 3.354Å [3] (Figura 2). Las propiedades del grafito como material lubricante se explican gracias a las débiles fuerzas de van der Waals, que facilitan el que cada hoja de grafeno se deslice una sobre la otra. Además, el grafito es un excelente conductor térmico y eléctrico debido a los electrones que se encuentran en el orbital π ; en contraparte, en dirección perpendicular al plano, el grafito es un mal conductor tanto térmico como eléctrico debido a las débiles fuerzas de van der Waals [3].

Otras formas alotrópicas del carbono han sido reportadas, como los fulerenos (estructuras moleculares de tipo C_{60} y C_{70}) (Figura 3) y los nanotubos (Figura 4) [4]. Estas estructuras se forman cuando los enlaces de los bordes de una capa de grafeno se cierran sobre sí mismas.



Figura 2. Diamante y grafito. Formas puras del carbono. En la parte inferior se observa la estructura molecular de estas dos formas alotrópicas del carbono. Tomado de [5]



Figura 3. Estructuras de los fulerenos (de izquierda a derecha y de arriba abajo, C20, C60, C70, C76, C82, C100 y C520). Tomado de [6]



Figura 4. Ilustración de la estructura de algunas formas de nanotubos. Se observa cómo presentan diferente quiralidad. A) nanotubo de pared sencilla, B) zigzag, C) Quiral. Tomado de [7]

Las propiedades físicas y químicas de los fulerenos han sido muy estudiadas y se han propuesto diversas aplicaciones: en celdas solares como aceptor de electrones para celdas solares orgánicas comerciales [8], por ejemplo.

Dependiendo de la forma en que se enrolle la lámina de grafeno para formar un nanotubo, serán las propiedades conductoras del material; pudiendo comportarse como metal o semiconductor [8].

Antes del descubrimiento de los fulerenos y los nanotubos, el carbón amorfo era el alótropo más común y conocido del carbono, posee capas apiladas de átomos de carbono que pueden describirse con el modelo de hibridación sp². Sin embargo, no forman una red covalente real, porque una fracción significativa de sus átomos poseen hibridación sp³. Esta mezcla de hibridaciones en los átomos de carbono interfiere con la formación de una red covalente regular. Y aunque posee orden entre las primeras capas de vecinos, este orden se pierde rápidamente y parece más bien amorfa. El carbón amorfo se prepara por pirólisis de polímeros orgánicos o de hidrocarburos a temperaturas mayores de 1500° C. Es usado principalmente como combustible. Con ciertos tratamientos químicos, que aumentan la superficie, se obtiene el carbón activado, utilizado como adsorbente, catalizador e incluso como electrodo.



Figura 5. Diagrama del ciclo del carbono. Se muestran los principales reservorios de carbono. Los números rojos muestran los flujos de carbono en petagramos de carbono por año, los números azules representan la cantidad de carbono en cada reservorio en petagramos. Modificado de [9]

Al combinarse con otros átomos como el hidrógeno, el oxígeno, el nitrógeno, entro los más comunes, el carbono da origen a un gran número de moléculas, objeto de estudio de la química orgánica. Sin embargo, este trabajo se enfocará en el átomo de carbono y sus isótopos.

En la naturaleza, existen dos isótopos estables y uno radiactivo del carbono: ¹²C, ¹³C y ¹⁴C, respectivamente. El isótopo de carbono predominante, el ¹²C, constituye un 99.9% del total del carbono; el ¹³C, tiene una abundancia de un 0.1%. Mientras que la proporción de ¹⁴C con respecto al ¹²C es de tan solo uno en 10¹² [10]. La característica del ¹⁴C, radica en que es un núcleo inestable debido al número de neutrones que forman su núcleo. La vida media del ¹⁴C átomo se ha establecido en 5730 años [11]. En la Tierra, el carbono se encuentra formando muy diversos compuestos que se encuentran distribuidos en depósitos o reservorios, entre los cuales encontramos al petróleo, la atmósfera, los océanos y la biósfera (Figura 5).

El carbono se encuentra ampliamente distribuido en la Tierra, ya sea en forma gaseosa como CO₂, CO o hidrocarburos sencillos como el metano. Pero también es componente de hidrocarburos líquidos y sólidos formando moléculas orgánicas.

El átomo de carbono también se combina con otros átomos como oxígeno, nitrógeno, azufre, halógenos, etc. para formar multitud de compuestos con propiedades físicas y químicas que permiten clasificarlos de acuerdo a los grupos funcionales que poseen. Entre ellos encontramos a los alcoholes, los ésteres, los éteres, las cetonas, los ácidos carboxílicos, los halogenuros, etc. El análisis elemental de los diversos compuestos que contienen carbono es indispensable para aplicarlo en diversas áreas como: medicina, farmacia, agroquímica, perfumería, textil; incluso en ciencias como la arqueología o forense donde es necesario determinar fechas a través del estudio del átomo de carbono.

3. El carbono en la naturaleza

El petróleo es uno de los grandes reservorios de carbono que existen en la Tierra, que se forma por la descomposición de plantas y animales que vivieron hace más de 500 millones de años. Se cree que el petróleo se produce por la acción combinada de presión, temperatura y la presencia de microorganismos anaerobios.

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, desde los simples como el metano hasta las grandes moléculas de hidrocarburos o complejas como los naftenos, compuestos aromáticos cíclicos, compuestos cíclicos con heteroátomos como azufre, nitrógeno y oxígeno, entre muchos otros. Su composición elemental es de aproximadamente 85% carbono; 12% hidrógeno; 3% azufre, oxígeno, nitrógeno y algunos elementos metálicos, así como elementos traza. [12].

En otro reservorio, la atmosfera terrestre, el carbono existe principalmente en forma de CO₂ y constituye el 0.001% del carbono total global [9]. De acuerdo con las investigaciones geológicas, el contenido de CO₂ está asociado a la temperatura superficial del planeta Tierra. Aún y cuando la atmosfera es un reservorio de carbono relativamente pequeño, los cambios en las concentraciones de sus componentes tienen efectos más rápidos y sus repercusiones ocurren a mayores escalas, incluso a nivel escala global, con efectos medibles en otros ecosistemas.

El carbono se libera a la atmosfera por la acción de los seres vivos en la respiración o metabolismo, combustión de material orgánico y quema de combustibles fósiles, erupciones volcánicas e incluso cuando una meteorita suficientemente grande impacta la Tierra. En tanto que las formas en las que el CO₂ es tomado de la atmosfera va desde la fotosíntesis y disolución en océanos, hasta la formación de carbonatos por la disolución del CO₂ en la lluvia y su posterior reacción con los minerales. El carbono en la hidrósfera proviene directamente del CO₂ atmosférico. La totalidad del carbono inorgánico disuelto en los océanos es 50 veces mayor que el que se encuentra en la atmósfera [13]. El dióxido de carbono atmosférico es intercambiado continuamente con el de los océanos en la superficie marina. El proceso de intercambio comienza con la disolución del CO2 en el agua para, posteriormente, formar ácido carbónico que reaccionan con los carbonatos y el agua, precursores del ion bicarbonato. Cabe mencionar que el CO₂ es más soluble en aguas salinas y frías, por lo que el proceso de intercambio de dióxido de carbono con el agua de los océanos se ve regulado por la formación de densas masas de hielo en latitudes altas [13]. Algunos procesos biológicos también contribuyen a la absorción del dióxido de carbono atmosférico: la fotosíntesis de fitoplancton disminuye la presión parcial del CO₂ en la superficie de los océanos favoreciendo la absorción de este gas. Además, algunas especies de fitoplancton y zooplancton generan conchas de CaCO₃ que, al morir, precipitan al fondo de los océanos mientras que una fracción pequeña de los carbonatos es disuelta en al agua de mar. El dióxido de carbono disuelto en los océanos se encuentra en tres formas: i) CO₂ disuelto (constituye el 1% del total) que puede intercambiarse en la atmósfera. ii) iones bicarbonato (aproximadamente 91%). iii) ion carbonato (8% del total) [14]. La suma de estas especies químicas constituye el carbono inorgánico disuelto (CID).

En la biosfera, la concentración del carbono es aproximadamente tres veces mayor a la de la concentración del carbono en la atmosfera [13]. Los compuestos de carbono en la biósfera se encuentran distribuidos en forma de biomoléculas tales como carbohidratos, proteínas, lípidos o ADN; a diferencia del carbono que se encuentra en los océanos en forma de CID.

La manera en que el carbono se integra a la biósfera inicia con la fotosíntesis que realizan plantas, árboles y algunos microoganismos. En las plantas, el dióxido de carbono se adquiere por difusión a través de los estromas, el cual es metabolizado por medio de la fotosíntesis, proceso que utiliza la energía solar y agua para la

biosíntesis de carbohidratos. Los glúcidos son los carbohidratos más abundantes en la biosfera, además de ser las moléculas de reserva energética más importantes. Los glúcidos se agrupan en tres clases: los monosacáridos, oligosacáridos y polísacáridos. Los monosacáridos como la glucosa o la fructosa, están formados por una sola molécula. Los oligosacáridos son cadenas cortas de monosacáridos, como la sacarosa o azúcar de caña. En tanto que los polisacáridos son macromoléculas por largas cadenas formadas por centenares o miles de unidades de monosacáridos, como la celulosa, el glucógeno o el almidón [15]. Los polisacáridos pueden contener enlaces glucosídicos (entre cada molécula de monosacárido) de tipo alfa (α) o beta (β). Los enlaces alfa son más débiles, y se rompen y forman con gran facilidad y se encuentran en los polisacáridos con funciones de reserva, como el almidón o el glucógeno. Mientras que el enlace tipo beta es mucho más estable y resistente, característico de polisacáridos con función estructural, como la celulosa y la quitina. La celulosa es el polisacárido más abundante en la Tierra, una sustancia resistente, insoluble en agua y con aspecto fibroso. En tanto que la quitina es el segundo polisacárido más abundante. La quitina se encuentra en hongos, levaduras y algas mientras que, en los animales constituye la cutícula de artrópodos, anélidos v moluscos.

El que algunas especies de árboles vivan por miles de años, permite disponer de registros de las concentraciones atmosféricas de carbono de épocas pasadas. En estos árboles queda evidenciada la estabilidad y resistencia de los enlaces glucosídicos β en la celulosa aún por largos periodos de tiempo.

En la cadena alimenticia, las plantas forman parte de los primeros eslabones y sirven de sustento para que los animales obtengan energía en forma de carbohidratos y otros nutrientes necesarios para su subsistencia. Es a través de esta cadena que el carbono es transferido de un organismo a otro, de los autótrofos a los heterótrofos y en ellos de los inferiores a los superiores. En los animales, el carbono es almacenado en biomoléculas tales como proteínas, carbohidratos, lípidos y ADN.

Aproximadamente la cuarta parte de las proteínas del cuerpo humano son colágeno [16]. A pesar de ser una estructura relativamente simple, el colágeno tiene funciones críticas: proporciona soporte y ligadura, así como protección a diversos tejidos blandos y al sistema óseo. El principal constituyente orgánico de huesos y dientes

10

también es el colágeno. Las unidades químicas que componen al colágeno, son los siguientes aminoácidos: 35% glicina, 11% alanina y 21% prolina e hidroxiprolina [15]. El colágeno posee una estructura helicoidal formada por el entrecruzamiento de tres cadenas poliméricas. Al calentarse, el colágeno se desnaturaliza y sus hélices se desenrollan y pierden su conformación. Al enfriarse, las cadenas del colágeno se rearreglan en forma de red capaz de dispersarse en agua en forma de gel.

2. El ¹⁴C

1. Descubrimiento

Los átomos de ¹⁴C son los isótopos más pesados del carbono, con una composición de seis protones y ocho neutrones en su núcleo. Su descubrimiento es relativamente reciente; en la década de 1930, cuando se descubre la transmutación del nitrógeno a ¹⁴C, por la acción de neutrones. En un principio, se intentó irradiar compuestos nitrogenados con neutrones para comprobar el descubrimiento. El experimento consistió en colocar 100 kg de nitrato de amonio en un ciclotrón, con el objetivo de acelerar neutrones y hacerlos colisionar con el NH₄NO₃. De esta forma, - suponían- el ¹⁴CO₂ o ¹⁴CO quedaría ocluído en los cristales de nitrato de amonio; al liberar los gases sería posible detectar la radiactividad del ¹⁴C [17].

Este hecho marcó el inicio de la tesis doctoral de Samuel Ruben, quien supuso que el número de átomos necesarios para realizar un análisis de radiactividad de ¹⁴C correspondía con el número de átomos necesarios para analizar ³⁵S. El ¹⁴C y el ³⁵S decaen con una energía de 170 keV, lo que hizo suponer que la vida media de ambos era similar (4 meses para el ³⁵S) [17]. Al realizar el bombardeo del compuesto nitrogenado, sólo generó un átomo de los 25000 necesarios para realizar un análisis preciso. Con la instrumentación de aquella época, no fue posible detectar radiactividad. Años más tarde, Samuel Ruben conoció a Martin Kamen. Ambos retomaron el experimento y propusieron bombardear una placa de grafito con deuterio. Pero no contaban con que el grafito contenía una cantidad suficiente de ¹³C como para convertirla en ¹⁴C, lo que hizo que esta vez pudieran detectar el ¹⁴C producido. Tras realizar los experimentos de detección de radiactividad llegaron a la conclusión de que su vida media rondaba los 25000 años [18]. Una de las

primeras aplicaciones del isótopo de ¹⁴C fue como marcador para conocer la ruta del carbono en el proceso de la fotosíntesis [17].

2. Formación

Otro descubrimiento en la historia del ¹⁴C fue la producción de neutrones en la atmosfera por acción de los rayos cósmicos [19]. Los rayos cósmicos son núcleos con alta energía, principalmente de H y He, los cuales viajan a velocidades cercanas a la de la luz a través de toda la galaxia [1]. El origen de estas partículas no es claro, aunque se ha propuesto la hipótesis de que tienen su origen en la explosión de supernovas [1].



Figura 6. Producción y distribución del ¹⁴C. El choque entre rayos cósmicos y átomos de ¹⁴N produce ¹⁴C, este se oxida rápidamente y se mezcla en la atmósfera. A través del proceso de fotosíntesis

entra a la biósfera, mientras que para entrar a los océanos se disuelve y se convierte en carbono inorgánico. Modificado de [10].

Al ingresar a la Tierra, los rayos cósmicos, chocan con los núcleos atómicos de los átomos que se encuentran en su trayectoria. La colisión con estas partículas con tan altas energías cinéticas, resulta en la fragmentación de dichos núcleos. Este proceso es llamado espalación [20]

Cuando uno de los neutrones generados por el proceso de espalación posee la suficiente energía e impacta al núcleo de un átomo de ¹⁴N presente en la atmósfera terrestre, se genera un átomo de ¹⁴C de acuerdo con la reacción (Figura 6):

Esta es la ecuación que describe la cosmogénesis del ¹⁴C. Los rayos cósmicos están sujetos a variaciones producidas por cambios en el viento solar y la intensidad del campo magnético terrestre [21]. Pero se estima que, en promedio, se forman 1.57 átomos de ¹⁴C*cm^{-2*}s⁻¹ [21].

El núcleo de ¹⁴C, radiactivo, se desintegra y transmuta a ¹⁴N con la emisión de una partícula beta; la vida media del ¹⁴C ha sido calculada en 5730 años, y procede de acuerdo a la siguiente ecuación [21]:

$$^{14}C \rightarrow ^{14}N + \beta^{-} + antineutrino + 156 keV$$

El ¹⁴C comparte las propiedades químicas de los otros dos isótopos de carbono: por lo que en presencia de O₂ se oxida a ¹⁴CO₂ y ¹⁴CO, que, de la atmósfera, son incorporados a la biósfera y océanos en el ciclo del carbono. A través de la cadena alimenticia, este isótopo se incorpora a los tejidos de todos los seres vivos. Es en este momento en el que se establece un equilibrio entre la concentración de ¹⁴C en los tejidos, que se regeneran periódicamente, y la concentración de ¹⁴C en la atmosfera.

3. Metodos de detección

La datación con ¹⁴C se basa en la suposición de que el ¹⁴C producido naturalmente, tiene una huella única que es la misma en la atmósfera y en la biósfera, huella que comienza a diferenciarse al morir el organismo. Esta idea se basa en el hecho de que existe un intercambio continuo de materia orgánica en un sistema homogéneo que contiene ¹⁴C; por tanto, se logra un equilibrio entre los seres vivos con la atmosfera. Cuando un organismo muere, el equilibrio se altera y la concentración de



Figura 7. Gráfico utilizado por Williard F. Libby para calcular la vida media del ¹⁴C. Para hacerlo se basó en diferentes muestras con edades conocidas.

¹⁴C será la que había en la atmosfera al momento de la muerte. A partir de estas consideraciones, se puede calcular la concentración de ¹⁴C de acuerdo a la ley de decaimiento radiactivo.

Sin embargo, para realizar los cálculos es necesario conocer con exactitud la vida media del ¹⁴C. La primera aproximación la realizaron Ruben y Kamen [18], con un valor de 25000 años. Posteriormente se determinó una vida media de 5568 años. El valor más exacto que se ha calculado es de 5730 años; pero, por convención se usa la vida media de 5568 años.

El uso de radiocarbono para el fechamiento de muestras fue propuesto por Williard F. Libby y colaboradores en 1946. Libby demostró que el tiempo transcurrido desde la muerte de un organismo podría ser determinado midiendo la actividad del ¹⁴C en los restos de los organismos. Libby es considerado el creador de la datación con ¹⁴C, descubrimiento que le hizo merecedor del premio Nobel de química en 1960. Los trabajos de Libby y colaboradores se realizaron contando los decaimientos de

radiocarbono en muestras de varios gramos de carbono negro obtenida de objetos cuyas edades eran conocidas (Figura 7). Sin embargo, las pruebas nucleares realizadas en los años 1950 introdujeron errores en este tipo de medidas por el incremento en la concentración de radiocarbono antropogénico.

El primer método desarrollado para cuantificar al ¹⁴C consistió en concentrar al isótopo pesado del carbono. Posteriormente, se utilizó una columna de separación isotópica; pero era costosa y poco sensible al decaimiento del ¹⁴C, por lo que, no era factible el realizar la datación de materiales orgánicos con este método.

Lo siguiente prueba fue el desarrollo de un contador de gas proporcional, que cuantificara el decaimiento radiactivo del carbono. Las muestras eran convertidas en CO₂, acetileno e incluso en carbón sólido. Dentro de los contenedores se introdujo un contador Geiger, con el propósito de asegurar que el contador detectaba solamente la radiación emitida por el ¹⁴C. Las paredes fueron blindadas con placas de hierro de ocho pulgadas de grosor. Asegurando que la radiación de fondo, no interfiriera con el análisis. Con esta propuesta para cuantificar el ¹⁴C, fue posible realizar algunas determinaciones de la edad de algunos objetos. Este método, está basado en el conteo de la descomposición de los átomos de ¹⁴C. Cuando un átomo de ¹⁴C decae, emite una partícula beta, que puede ser detectada en un gas por el impulso eléctrico que genera.

El método se desarrolló a partir de técnicas de detección usadas en física nuclear y se adaptó a requerimientos donde es necesario detectar bajas concentraciones de emisiones radiactivas en gases. Los gases usados en estas técnicas van desde CO₂, CH₄, C₂H₂ y C₂H₆. Sin embargo, el gas predilecto para estas técnicas es el CO₂ por ser el que se produce como producto primario en todos los métodos, por ser producido con alta pureza, por sus propiedades criogénicas lo que minimiza la contaminación y por ser usado como método de calibración de otras técnicas [22].

Para obtener el CO₂ necesario para realizar el análisis es necesario someter las muestras a combustión.

Existen dos tipos de contadores de decaimiento para gas: los tubos de cuarzo con una capa delgada de un óxido [23], que posteriormente se cambió por una lámina de oro. Y los de tubos de cobre de alta pureza. En un principio los contadores se fabricaron para minimizar la distorsión del espectro debida a la recolección de carga

15



Figura 8. Principio del funcionamiento de detección de emisión beta por centelleo líquido. El solvente absorbe una porción de la energía de la emisión beta hasta llegar a un fluoróforo, este absorbe la energía y la reemite en forma de luz. Modificado de [24]

incompleta. No obstante, se comprobó que el uso de placas de cuarzo era suficiente para proporcionar una operación estable.

La precisión de este método es de menos de 1%, y la cantidad de carbono que se requiere para realizar un análisis es de menos de 10g. El tiempo de análisis es de una semana o más. [22].

Otro método basado en la desintegración beta es el de centelleo de líquidos. En ellos las partículas beta resultantes de la desintegración de isótopos tales como el ³H, ¹⁴C y ³²P, excitan la emisión de luz en moléculas orgánicas *centelleantes*, como el benceno [22] (Figura 8). El benceno es una molécula ideal porque contiene carbono derivado completamente de la muestra, es un excelente disolvente para centelleadores y tiene muy buenas propiedades de centelleo y transmisión de luz.

El método de centelleo proporciona una precisión de +/- 2% de carbono moderno (pMC), precisión comparable a la de los contadores de gas proporcional modernos. El tiempo de análisis en los equipos de centelleo es de más de 48 horas, que asegura la obtención de suficientes desintegraciones para obtener errores bajos. Pero debido a que en un gramo de carbono se producen alrededor de 13.5 desintegraciones por minuto, para realizar mediciones precisas, requiere de muestras cuyo contenido de carbono sea de al menos varios gramos. Cuando se compara la cantidad de ¹⁴C con la cantidad de ¹²C en una muestra; las proporciones son de 1 en 10¹², lo que significa que en un gramo de carbón hay 5*10⁵ átomos de ¹⁴C. Sólo el 1% de estos decae en un período de 80 años, además, en un solo día de medición sólo hay 104 desintegraciones que pueden detectarse. Con los métodos radiométricos el error que se presenta es de aproximadamente de +/- 80 años en los resultados.

La limitante de las técnicas de datación derivadas del método desarrollado por Libby, puede superarse mediante la medición directa del número de átomos de ¹⁴C en las muestras. De esa forma es posible mejorar la sensibilidad de la datación. Pero los primeros intentos de realizar mediciones directas del número de átomos de ¹⁴C utilizando espectrometría de masas convencional fallaron. En 1977 fueron desarrollados los primeros equipos acoplados a aceleradores de partículas y espectrómetros de masas que permitieron realizar esta separación con gran precisión, utilizando, además, técnicas nucleares de análisis. Este método es conocido como de espectrometría de masas con acelerador (EMA o AMS, por las siglas en inglés de Accelerator Mass Spectrometry). La técnica de EMA, ha evolucionado hasta convertirse en un método estándar en datación. Con ella es posible medir muestras de 34000 años de edad con una precisión del 10% (+/- 830 años) en minutos y utilizando desde 0.25 mg de muestra. en contraste con los métodos radiométricos que requieren hasta 50 g de la misma muestra para obtener la misma precisión [22]. Otra ventaja de la EMA es detectar hasta el 1% de todo el ¹⁴C presente en una muestra. Esta eficiencia va de 100 a 1000 veces mayor a la técnica de centelleo líquido [22].

Otra de las grandes ventajas de la técnica EMA es la posibilidad de seleccionar mejor la muestra que será sometida a análisis. Es mejor analizar una fracción de interés de un fósil en vez de toda la pieza, además, del sedimento en que fue encontrada, semillas o restos de comida en vez de todo el material recuperado. Con un tratamiento químico previo, es posible obtener resultados más acordes con la fecha asociada a la muestra.

4. Pico de la bomba

El contenido de ¹⁴C en la atmosfera no es constante; existen diversos factores que modifican su concentración. Para conocer cómo se ha modificado la concentración de ¹⁴C, se ha recurrido al análisis de los anillos anuales de crecimiento de los árboles. La dendrocronología estudia los anillos de los árboles para determinar la edad y condiciones climáticas en que creció el árbol. La dendrocronología se desarrolló durante las primeras décadas del siglo XX. Y hasta 1950, la datación por medio de los arboles fue el único método preciso para determinar una fecha, hasta el desarrollo de la datación por medio de carbono ¹⁴C. Los primeros indicios de que



Figura 9. Nube con forma de hongo. Esta nube se formó tras el impacto de la bomba atómica sobre la ciudad de Hiroshima. Las diversas detonaciones nucleares contribuyeron al aumento de la concentración de ¹⁴C en todo el planeta. Obtenida de la Biblioteca del Congreso de Estados Unidos de América.

existen variaciones atmosféricas temporales fueron reportados por K. O. Münnich en 1957, a partir de muestras de roble alemán que fueron datadas por Bruno Huber [25]. En los años 50, a la par de Münnich, Hessel de Vries comenzó a determinar el contenido de ¹⁴C en los anillos, confirmando que la concentración de ¹⁴C cambia en función del tiempo [26]. Él encontró variaciones de ¹⁴C del 2% con respecto al promedio que se había establecido para el periodo de 1525 a 1935 A.D. Además, observó que durante 1600 y 1800 A.D., la concentración de ¹⁴C disminuyó en 2% [22]. Estas variaciones se estudiaron por distintos laboratorios en Cambridge, Copenhague y Heidelberg. En el año de 1960, los tres laboratorios confirmaron las variaciones al presentar resultados de un árbol de la especie *sequoia* de más de 1300 años de antigüedad [22]. Tras este resultado, de Vries, propuso que los resultados de un análisis de ¹⁴C debían ser calibrados para poder convertirlos a una edad calendario. De ahí que el primer intento por presentar datos más precisos para calibración, se hizo en Uppsala en 1969 en el 12º Simposio sobre variaciones de ¹⁴C

Los factores que modifican la cantidad de ¹⁴C van desde temporales hasta antropogénicas. Las temporales se deben a alteraciones en la actividad solar, así como a variaciones en la intensidad del campo magnético terrestre. Estas variaciones se catalogan con el nombre de Efecto de Vries, por ser Hessel de Vries quien descubriera estas variaciones [27].

Además, las variaciones antropogénicas son debidas al Efecto Suess y a las detonaciones de bombas atómicas durante el periodo de 1950 a 1963. El Efecto Suess, propuesto por Hans Suess, consiste en la dilución de ¹⁴C atmosférico debida a la quema de combustibles fósiles [28], carentes de ¹⁴C.

Hessel de Vries fue pionero en descubrir que la concentración de ¹⁴C aumenta debido a la detonación de bombas nucleares (Figura 9) [29]. Sus resultados son producto de una investigación en diferentes regiones y en diversas muestras como plantas, conchas y caracoles. En esta investigación sólo se enfoca en demostrar el aumento de ¹⁴C; sin embargo, fue un primer paso para el desarrollo de la técnica de datación por ¹⁴C.

La era nuclear inició hace más de 50 años. Aunque Estados Unidos y Alemania iniciaron la producción de las armas nucleares. EUA contaba con la infraestructura y los científicos necesarios para concretar el proyecto de construcción de armas nucleares, que fue conocido como Proyecto Manhattan. Liderado por Julius Robert Oppenheimer, el proyecto consistió en desarrollar la bomba nuclear antes que Alemania. La primera bomba nuclear utilizada como arma y de fabricación estadounidense, se detonó el 16 de julio de 1945.

Tras las detonaciones efectuadas durante el periodo de la guerra fría, la entonces Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) desarrolló una réplica de la bomba de Nagasaki la cual fue puesta a prueba en agosto de 1949. Otra bomba fue detonada en septiembre de 1951. A EUA y la URSS le siguieron Reino Unido en octubre de 1952, Francia en febrero de 1960 y China en octubre de 1964.

Las bombas atómicas se basan en el proceso de fisión nuclear, que ocurre cuando un núcleo pesado, generalmente de uranio o plutonio, se divide en dos o más núcleos pequeños, además de algunos subproductos como neutrones libres, fotones y otros fragmentos del núcleo como partículas alfa y beta. El aumento en la producción de neutrones provoca un aumento en la producción de ¹⁴C. La reacción nuclear es la misma que provocan los rayos cósmicos; este aumento artificial en la

19



Figura 10. Pico de la bomba. Se muestran mediciones de la concentración de ¹⁴C después del año de 1950 de los hemisferios norte y sur. La línea roja muestra la concentración de ¹⁴C medido en la estación de investigaciones Jungfraujoch. Modificado de [10]

concentración de ¹⁴C en le Tierra es llamado antropogénico. Las detonaciones, además de ¹⁴C, generan otros núcleos como ⁵⁴Mn, ⁵⁵Fe, ⁹⁰Sr, ⁹⁵Zr, ¹⁰⁶Ru, ¹²⁵Sb, ¹³¹I, ¹³⁷Cs, ¹⁴⁴Ce, Pu y Am, también radiactivos capaces de producir diversas enfermedades en el ser humano.

Desde principios de 1960 se monitorea la concentración de ¹⁴C atmosférico para conocer el intercambio de carbono en la naturaleza [30]. A consecuencia de los ensayos nucleares, en el hemisferio norte, en los años de 1963 y 1964, la concentración atmosférica de ¹⁴C alcanzó niveles de más del 100% de lo que se encontraba antes de los ensayos nucleares [10]. En el año de 1963 se encontró un máximo en la concentración de ¹⁴C, denominado *Pico de la bomba* (Figura 10) [10].

Debido a la preocupación por el aumento de contaminantes nucleares, en el año de 1963 se firmó el Tratado mediante el cual se prohíben las pruebas de armas nucleares en la atmosfera, en el espacio exterior y debajo del agua. En este documento se declara que las pruebas nucleares se prohíben para poner fin a la carrera armamentista. Posterior al tratado de prohibición de ensayos nucleares, la concentración de ¹⁴C comenzó a disminuir por la incorporación del carbono a los océanos y a la biósfera [30]. El Efecto Suess es otro de los factores que influyen en la concentración del ¹⁴C de la atmosfera [31], principalmente en las grandes ciudades.

Durante los años de 1950 a 2010 las corrientes de aire provocaron que se distribuyera la cantidad de ¹⁴C en todo el globo terráqueo, como consecuencia se generaron cinco zonas de distribución de ¹⁴C, tres en el hemisferio norte y dos en el hemisferio sur [32].

5. Datación con ¹⁴C con el pico de la bomba

Tras las pruebas nucleares y el aumento de ¹⁴C denominado *Pico de la bomba,* surge la idea de utilizar estas marcas de ¹⁴C tanto en la atmosfera como en la materia viva. Las muestras se denominan modernas pues se comparan con las curvas de calibración obtenidas a partir del año de 1950. Así, nace la datación por Pico de la Bomba (Bomb-Pulse dating, en inglés).

Aunque el ¹⁴C que se incrementó durante los ensayos nucleares ha decaído durante un tiempo de casi una centésima parte de su vida media, la EMA mide la cantidad de átomos de carbono y no el decaimiento radiactivo como los métodos convencionales. Con base en este principio se han desarrollado métodos, principalmente en las ciencias forenses, para determinar la autenticidad de vinos, procedencia de drogas ilícitas y fechamiento de restos humanos [33] [34]

Así, la técnica de Espectrometría de Masas con Aceleradores es ideal para aplicaciones forenses con muestras posteriores al pico de la bomba, donde es necesario conocer la cantidad de átomos en una muestras para, posteriormente, compararla con una curva de calibración.

6. Fraccionamiento isotópico

Desde 1949 con Libby [35] hasta 1977, las medidas de ¹⁴C en las muestras se realizaron cuantificando la radiación beta emitida por los átomos de ¹⁴C debida a su decaimiento. En la década de los 80 surgió la técnica de EMA para datación con ¹⁴C. Como se mencionó, la característica de esta técnica es que, en lugar de

detectar la actividad¹ [36] de los átomos de ¹⁴C, se obtienen las proporciones isotópicas de los átomos de carbono. Cuando se realiza el análisis con ¹⁴C es necesario tener en cuenta el fraccionamiento isotópico para comparar adecuadamente las cantidades de ¹⁴C de una muestra con un estándar o una curva de calibración.

La fracción isotópica se expresa como la desviación (δ^{13} C) de la razón 13 C/ 12 C de la muestra comparada con el estándar VPDB (Belemnita de Vienna Pee-Dee) y se expresa en partes por mil como:

$$\delta^{13}C = \left[\frac{\binom{13}{12}C}{\binom{13}{12}C} - \binom{13}{12}C \frac{13}{12}VPDB}{\binom{13}{12}C}\right] *1000$$

El estándar VPDB era un carbonato de calcio procedente de un fósil de belemnita del Cretácico, de la formación Pee-Dee de Carolina del Sur en Estados Unidos [36]. Este estándar tiene una proporción de ¹³C/¹²C de 1.12372% [36]

El fraccionamiento isotópico es un proceso que ocurre tanto en reacciones químicas como en procesos físicos. El efecto del fraccionamiento es una separación parcial de los diferentes isótopos y resulta en el enriquecimiento preferencial de un isótopo sobre otro.

En el ciclo del carbono el fraccionamiento isotópico ocurre cuando este átomo es transferido de un ecosistema a otro. En el proceso de fotosíntesis, el CO₂ es captado por las hojas de las plantas y árboles; es en este momento donde el ¹²CO₂ se capta en mayor proporción que el ¹³CO₂ y este, a su vez, más que el ¹⁴CO₂. Se ha observado que en la celulosa extraída de diversas plantas y árboles se encuentra enriquecida un 2% más con ¹²C que con ¹³C [36]. La primera explicación de este fenómeno se debe a un proceso cinético donde juega un papel importante la masa de los átomos. Además, los enlaces formados por los isótopos más ligeros son menos energéticos que los de los isótopos pesados [37]. Cuando los vegetales captan el CO₂ lo hacen dando prioridad a las moléculas que se absorben más rápido, es decir, las formadas por ¹²C principalmente. Además, como la energía para romper los enlaces carbono-oxígeno es menor, se fijan preferentemente las moléculas de dióxido de carbono con isótopos ligeros [37].

¹ La actividad se define como el número de electrones emitidos por el decaimiento beta del ¹⁴C por unidad de tiempo y peso de la muestra.

Otro motivo por el que ocurre el fraccionamiento isotópico, radica en el tipo de metabolismo utilizado por las plantas. Las plantas son divididas en tres grupos, de acuerdo a la ruta fotosintética o metabolismo: C3, C4 y CAM. Las plantas de tipo C3 que incluye árboles, arbustos y diversas plantas herbáceas, denominadas pastos. La denominación C3 proviene de las características enzimáticas del Ciclo de Calvin. Este proceso se realiza a través de la captura de CO₂ por la enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco), la cual, al realizar su actividad de carboxilasa, deriva en dos moléculas de tres carbonos llamadas 3-fosfoglicerato [38].

Las plantas con metabolismo C4 no son tan numerosas como las C3. Son plantas que se han adaptado a climas cálidos donde la temperatura dificulta la fijación del carbono [39]. Estas adaptaciones hacen más eficiente la fijación de CO_2 en este tipo de climas. La denominación C4 proviene de las características anexas al Ciclo de Calvin. En las plantas C4 la primera enzima receptora de CO_2 es la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) [39]. Esta produce un ácido carboxílico de cuatro carbonos (malato y/o aspartato) al entrar en contacto con el CO_2 .

El grupo CAM (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas, en español) [39], incluye a las plantas de climas desérticos, por ejemplo los *cactos*. Su metabolismo puede intercalarse entre C3 y C4 dependiendo de las condiciones climáticas y de las concentraciones de CO₂, lo que evita producir intermediarios que utilizan más energía.

La diferencia en el fraccionamiento en cada tipo de plantas, se debe a la enzima Rubisco, que tiene un valor de discriminación intrínseca contra ¹³C de $-30^{\circ}/_{oo}$. En contraste, la PEP carboxilasa, tiene una menor discriminación de ¹³C con un valor entre -2 y -6 $^{\circ}/_{oo}$ [39]. De manera análoga, la actividad del ¹⁴C en las plantas y árboles no es exactamente la misma que en la atmósfera; las proporciones isotópicas de carbono no son las mismas en vegetales que la que en la atmósfera.

7. Normalización

La técnica de EMA en lugar de medir la actividad específica de las muestras, mide las proporciones de los isótopos ($^{14}C/^{12}C$) y ($^{14}C/^{13}C$). La actividad específica de una muestra es proporcional a

$$\frac{N(14C)}{N(12C) + N(13C) + N(14C)} \approx \frac{N(14C)}{N(12C) + N(13C)} \approx \frac{N(14C)}{N(12C)}$$

donde $N(^{12}C)$, $N(^{13}C)$, $N(^{14}C)$ representan el número de núcleos de diferentes isótopos en la muestra. La última aproximación genera un error equivalente a 1 año de ^{14}C [36].

Teniendo en cuenta que se miden núcleos de carbono en diversas muestras y que estas se ven afectadas por el fraccionamiento isotópico, es necesario normalizar cada analito. La normalización consiste en corregir la actividad calculada de una muestra por efecto del fraccionamiento isotópico. Para esto es necesario trasladar la actividad de la muestra a la actividad de una madera con una composición isotópica estable; definida con un δ^{13} C=-25°/_{oo} [40].

Antes de proceder a la normalización se necesita introducir el factor de fraccionamiento de ¹³C que se define como:

$$\operatorname{Frac}\left(\frac{13}{12}\right) = \frac{\left(\frac{13C}{12C}\right)\left[\delta 13C = -25\right]}{\left(\frac{13C}{12C}\right)S}$$

El factor de fraccionamiento de ¹⁴C está dado por aproximadamente el cuadrado del factor de fraccionamiento de ¹³C [41].

$$Frac_{14/12} \approx Frac_{13/12} Frac_{14/13} \approx (Frac13/12)^2$$

De esta forma la actividad específica de una muestra, A_{SN}, está dada por:

$$A_{SN} = A_S * Frac_{14/12} = A_S * \left[\frac{\left(\frac{13C}{12C}\right) [\delta 13C = -25]}{\left(\frac{13C}{12C}\right) S} \right]^2$$

Usando la definición de δ^{13} C y realizando reacomodo de términos, la ecuación anterior se reescribe como:

$$A_{SN} = A_S^* \left(1 - \frac{2(25 + \delta \ 13C)}{1000} \right)$$

Esta ecuación es una aproximación la cual da un error máximo de 1 % para valores de δ^{13} C entre -35 y +3 °/₀₀ [36]

8. Materiales estándar

Las mediciones con ¹⁴C se realizan comparando la actividad de las muestras con un estándar de actividad conocida. Es necesario realizar esto debido al decaimiento radiactivo del ¹⁴C, pues se presenta tanto en muestras como en estándares.

Considerando lo anterior se ha establecido un estándar absoluto para ¹⁴C. La actividad específica absoluta asociada a este estándar es de A_{Abs} =226 Bq/Kg C [42], definida como la actividad hipotética del carbono atmosférico en el año de 1950. En esta atmosfera hipotética se asume que no hay influencia humana y se ha normalizado a δ^{13} C=-25 °/_{oo.} Por tanto, A_{Abs} se expresa como:

$$A_{Abs} = A_{1950[-25]} e^{\lambda c(y-1950)}$$

Donde:

A_{1950[-25]}, es la actividad específica de la atmosfera hipotética en el año de 1950, normalizada a δ^{13} C=-25 °/_{oo} y que decae hasta el presente. Es de considerar que A_{1950[-25]} corresponde a la actividad medida en el presente, mientras que A_{Abs} se refiere a la actividad en 1950.

 $\lambda \boldsymbol{c},$ es la vida media Cambridge de 5730 \pm 40 años

y, corresponde al año en que se mide la muestra

De esta manera la exponencial convierte a A_{1950[-25]} al valor que podría haber tenido en 1950 [26].

El principal estándar de ¹⁴C fue el NIST ácido oxálico I, conocido como OXA I [36]. El estándar OXA I se obtuvo de una cosecha de betabel, en el tiempo en que la actividad específica del ¹⁴C comenzó a crecer debido a pruebas de armas nucleares. La actividad específica de OXA I (A_{OXI}) es 95% de la actividad específica en 1950 de OXA I normalizada a δ^{13} C=-19 °/_{oo} con respecto a VPDB [36]. La actividad normalizada de la muestra con respecto al estándar se representa con la siguiente ecuación:

$$Aon = 0.95AOXI \left(\frac{1 - \frac{19}{1000}}{1 + \frac{\delta 13C}{1000}}\right)^2 \approx 0.95AOXI \left(1 - \frac{2(19 + \delta 13C)}{1000}\right)$$

Este valor se corrige para el decaimiento desde 1950 para obtener la actividad absoluta específica del estándar internacional, AAbs:

$$A_{Abs} = A_{ON} * e^{\lambda c(y-1950)}$$

Donde $\lambda c = 1/8267 \text{ años}^{-1} \text{ e y es el año de la medición.}$

El estándar OXA I ya no se encuentra disponible comercialmente. En su lugar, se utiliza el estándar del National Institute of Standards and Technology (NIST) 4990C OXA II [30] [37], el cual también se normaliza tomando como referencia el OXA I.

$$Aon = 0.7459AOXII \left(\frac{1 - \frac{25}{1000}}{1 + \frac{\delta 13COXI}{1000}}\right)^2$$

Teniendo en cuenta que la actividad es proporcional al número de núcleos medidos de carbono [36] [43], la ecuación anterior puede reescribirse como:

$$\left(\frac{14C}{12C}\right)_{1950}[_{-25}] = 0.7459AOXI \left(\frac{1 - \frac{25}{1000}}{1 + \frac{\delta 13COXI}{1000}}\right)^2$$

9. Edad radiocarbónica y conversión a edad calendario

El porcentaje moderno de carbono es otra unidad empleada en la datación con ¹⁴C. Se representa como pMC (*percent modern carbon*) y es usado en muestras ambientales y aplicaciones post pico de la bomba. El pMC se define como [36]:

$$pMC = \frac{AmN}{Aon} * 100$$

Donde AmN es la actividad normalizada de una muestra y AON es la actividad normalizada del estándar utilizado.

Esta proporción es constante en el tiempo.

Del porcentaje moderno de carbono se deriva otra unidad conocida como fracción moderna [43], F, que se define como:

$$F = \frac{\left(\frac{14C}{13C}\right)_{m}[.25]}{\left(\frac{14C}{13C}\right)_{1950}[.25]} = \frac{\left(\frac{14C}{13C}\right)_{m}[.25]}{0.9558\left(\frac{14C}{13C}\right)_{0XI}[.25]} = \frac{AmN}{Aon}$$

Reimer et al [44] proponen que, para evitar problemas con los diferentes términos y símbolos en ¹⁴C, se use la fracción moderna de carbono F14C para muestras post pico de la bomba. De ahí que se defina a F14C como:

F14C=
$$\frac{AmN}{Aon}$$

De la misma manera que el porcentaje de carbono moderno (pMC) y la fracción moderna (F), el porcentaje de carbono moderno (F14C) no cambian con el tiempo.

Considerando la normalización, materiales estándar y las unidades anteriores, es posible replantear la ley de decaimiento radiactivo en términos de expresiones revisadas hasta el momento. De manera equivalente se puede reescribir como:

$$AmN = Aon * e^{-\lambda t}$$

Rearreglando términos se obtiene:

$$F^{14}C = \frac{AmN}{Aon} = e^{-\lambda t}$$

Por convención, el año 1950 AD se coloca como t=0 donde λ en este caso es la constante de decaimiento de Libby que se define como $\lambda_{L} = 1/8033$ años⁻¹ [36]. Es importante notar que no es la misma constante de decaimiento de Cambridge. La edad ¹⁴C convencional está dada por [30] [34] [37]:

$$T_{14C} = \frac{1}{\lambda L} ln \left(\frac{AmN}{Aon} \right) = -8033 ln F^{14}C$$

Para conocer la edad calendario es necesario usar las curvas de calibración obtenidas por las medidas hechas a los anillos de crecimiento de los árboles. Como se expuso anteriormente, la concentración de ¹⁴C no ha sido constante y ha tenido variaciones temporales y antropogénicas. Para corregir estas variaciones se necesitan curvas de calibración por área geográfica; tomando en cuenta que el ¹⁴C se distribuye alrededor de la Tierra por acción de las corrientes de aire [45].

10. Análisis de ¹⁴C por EMA

La espectrometría de masas es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. Requiere cantidades pequeñas de muestra y obtiene información característica como la masa y algunas veces la estructura del analito. Se fundamenta en la separación de las especies atómicas o moleculares en sus diferentes masas. El proceso general comprende cuatro etapas (Figura 11): 1) lonización de la muestra, 2) Aceleración de los iones por un campo eléctrico, 3) Dispersión de los iones según la relación masa/carga, 4) Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica. Dada la necesidad de detectar y cuantificar las concentraciones de átomos en una muestra, se ha mejorado la técnica de espectrometría de masas acoplándola a aceleradores de partículas.

La técnica de EMA surgió en la década de los 70 del siglo pasado en los laboratorios de física nuclear de baja energía. Su desarrollo se debe a la necesidad de contar con un método más preciso para conocer el decaimiento de ¹⁴C en una



Figura 11. Fundamento de la espectrometría de masas. El proceso de análisis consta de cuatro etapas 1) lonización, 2) Aceleración, 3) Dispersión de iones, 4) Detección. Tomado de [46]

cantidad de muestra más pequeña, de menos de 1g. Los principios del EMA provienen de una propuesta tras usar un ciclotrón como acelerador y detectar tritio satisfactoriamente [47]. Posteriormente dos investigadores, Nelson D. E [48]. y Bennet C.L. [49], usaron el acelerador en tándem de van de Graaff para reportar ¹⁴C presente en muestras naturales, el cual tenía bastantes ventajas sobre el ciclotrón como el hecho de acelerar los tres isótopos a la vez, así como generar iones negativos para analizar la muestra. Por eso los separadores isotópicos se construyeron con base en aceleradores electrostáticos en tándem. A partir de estos hallazgos se instalaron diversos EMA en Arizona, Oxford y Toronto, que comenzaron a desarrollar técnicas para detectar otros isótopos como ³⁶Cl, ¹²⁹l, ¹⁰Be y ²⁶Al, además del ¹⁴C [50].

La espectrometría de masas con acelerador es una técnica ultra sensible para contar átomos individualmente. La EMA es muy utilizada en el análisis y datación o geocronología utilizando ¹⁴C u otros isótopos cosmogénicos o raros.

El isótopo cosmogénico para el cual se han desarrollado más aplicaciones es el ¹⁴C. Existen 6*10¹² átomos de ¹⁴C en un gramo de carbón de una muestra moderna. De estos solo decaen 14 por minuto. Para lograr una precisión estadística del 0.5% con el método de decaimiento, serían necesarias 48 horas de análisis [50]. En contraste, un análisis con EMA con la misma precisión se puede lograr en 10 minutos y con una muestra de, cuando mucho, 1 mg [50].

La técnica convencional de espectrometría de masas no puede usarse para cuantificar ¹⁴C, debido a un enorme flujo de átomos isobaros como el ¹⁴N y a las diferentes especies moleculares con la misma masa que el ¹⁴C como ¹³CH, ¹²CH, ¹²CD y ⁷Li₂. Estos factores hacen que solo sea posible obtener una relación isotópica de ¹⁴C/¹²C del orden de 10⁻⁷.

La técnica de EMA combina la espectrometría de masas con una excelente discriminación contra interferencias isobáricas y de especies moleculares acoplando un acelerador de partículas, alcanzando un límite de detección de hasta 10⁻¹⁵, esto se logra debido a [50]:

- El uso de iones negativos, lo cual previene la interferencia debida a átomos isóbaros (el ¹⁴N no forma iones negativos [51], por lo que, en un análisis de ¹⁴C este factor es despreciable).
- La disociación de iones moleculares y el proceso de desprendimiento de electrones (*stripping*) de iones atómicos a estados de carga altamente positivos, posterior a la primera etapa de aceleración. Gracias a este proceso se previene la interferencia debida a moléculas con la misma masa que el átomo en cuestión (por ejemplo, ¹²CH y ¹³CH) [52].
- Empleo de una segunda etapa de aceleración seguida de la identificación de iones individuales; lo que permite un conteo individual de los iones, de esta forma cuando alcanzan el detector son fácilmente separados por sus diferentes energías [52].

Existen nuevos sistemas de EMA de operación más simple y capaces de trabajar a energías más bajas, desde los 0.2 MeV hasta 1 MeV, reduciendo los costos de instalación. En la Figura 12 se muestran las tres zonas en las que, en general, se dividen los sistemas EMA [50].


Figura 12. Etapas características en un sistema de medición por EMA asociado a un acelerador tándem.

- Zona de baja energía: Se encuentran dos elementos principales, la fuente iones que es donde se forma el haz de iones de la muestra, y el sistema inyector formado por un conjunto de elementos que permiten filtrar masas y llevarlas hasta el acelerador.
- Acelerador: En su interior se produce la aceleración de los iones que han superado los filtros cinemáticos de la zona de baja de energía y el proceso de *stripping* para eliminar a la mayoría de las especies moleculares formadas en el proceso de ionización de la muestra.
- Zona de alta energía: Se realiza la selección final de masas mediante deflectores magnéticos y eléctricos, e incluye el sistema final de detección del isótopo ¹⁴C.

Las muestras son convertidas en grafito mediante reducción catalítica, a partir de CO₂, producto de la combustión o reacciones químicas. El grafito es prensado en pequeños cilindros metálicos, denominado cátodo. Dichos cátodos, se llevan a un carrusel en el acelerador, donde comienza el proceso de análisis con la fuente de iones.

Fuente de iones

Es el primer elemento del sistema y en ella se producen los aniones X⁻ a partir de la muestra que se requiere analizar. Se considera como un primer filtro porque no todos los elementos forman aniones estables como es el caso del ¹⁴N, un isóbaro del ¹⁴C por lo que de inicio ciertas partículas dejan de interferir. Algunas de las características que debe reunir una fuente de iones, es tener una alta corriente extraída, es decir, un flujo de partículas cargadas lo suficientemente alta como para medir concentraciones pequeñas de algún isótopo, ya que al aumentar el recuento de iones se obtiene una mejor estadística. Los efectos de memoria deben ser lo

mínimos, para que el material extraído de la muestra no afecte a las que prosiguen por contaminación. Dado que las muestras son pequeñas, se espera una alta eficiencia de ionización, además de pocas fluctuaciones a corto y largo plazo en la corriente de salida de la fuente –estabilidad– y que el diseño de la fuente permita un cambio ágil de muestras.

La fuente de iones funciona mediante la vaporización de cesio [Cs] y la formación de un haz de iones de Cs+ en fase vapor por ionización térmica, el haz es dirigido estableciendo una diferencia de potencial con la muestra, dado lugar al proceso de sputtering, la emisión de átomos o moléculas que reciben en la colisión un impulso igual o superior a su energía de ligadura –que es la energía necesaria para descomponer en objeto en una de sus partes–. El resultado del sputtering es la emisión de aniones (X[^]-) de la muestra, que son repelidos de la superficie de la misma por la diferencia de potencia existente.

Acelerador

Los aceleradores tipo tándem son un tipo de instrumentación para acelerar partículas por medio de un campo electrostático. Consta de tres partes, un tubo de aceleración de baja energía que conecta la entrada del acelerador con el terminal, el terminal que contiene el canal de *stripper* donde aplica el voltaje, y un segundo tubo de aceleración de alta energía que conecta el terminal con la salida del acelerador. La función de los tubos es regular el gradiente de potencial electrostático entre las líneas de análisis, una serie de electrodos unidos por resistencias producen un campo eléctrico uniforme que acelera las partículas. El voltaje se consigue usando un generador llamado en cascada, en el cual una señal se acopla capacitivamente a una serie de dinodos que rectifican la señal y la suman a un alto voltaje DC. Como el sistema tiene forma de T se conocen como Tandetrones.

Todo el sistema anterior se encuentra inmerso en un tanque lleno con un gas dieléctrico, hexafluoruro de azufre SF₆. Cuando los iones entran en el terminal ocurre el llamado *stripping*, en el que que los iones intercambian carga con un material solido o gaseoso. De esta forma, pasan de ser aniones a cationes con un estado de carga q=+1. Como consecuencia de este cambio de polaridad, el haz final es repelido por el voltaje positivo del terminal y acelerado hacia la segunda sección del tubo. El *stripper* es fundamental para la eliminación de fondo molecular. Las especies moleculares pierden electrones a consecuencia de los choques que sufren

con el gas. En sus nuevas configuraciones son inestables, porque pocas moléculas son estables con estados de carga 2+ y ninguna sobrevive a partir de estados de carga 3+. Otra de las ventajas de usar altas energías por medio del acelerador es la posibilidad de *contar* partículas mediante detectores desarrollados para las técnicas nucleares de análisis, lo que permite distinguir a los isótopos de interés, aunque hayan superado los filtros anteriores.

Zona de alta energía

En esta sección se realiza la selección final de las partículas que salen del acelerador de forma similar a la zona de abaja energía, ya que el sistema cuenta con un deflector magnético, un deflector electrostático, y un sistema de transporte y focalización. A la salida del acelerador se tiene un haz compuesto de isóbaros, especies con la misma masa. Después de un triplete de lentes cuadripolares, está colocado un deflector magnético con mayor resolución que el de la zona de baja energía. Entre el deflector magnético y el detector de partículas se encuentra un deflector electrostático, que selecciona los estados de carga. El propósito de los deflectores es hacer un análisis en EM/q2 y E/q sobre los fragmentos moleculares formados en el acelerador. El sistema también cuenta con un conjunto de cámaras Faraday, en las cuales se miden tanto el ¹²C como el ¹³C.

Sistema de detección

Al final del sistema se dispone de detectores derivados de las técnicas nucleares de análisis y capaces de medir distintas propiedades físicas de una partícula, como su velocidad, la energía total o poder de frenado. Además, resuelven ambigüedades que no hayan sido resueltas por los deflectores. La detección del isótopo problema se realiza mediante una cámara de ionización multianódica, que consiste en un cilindro que contiene isobutano y consta de un par de placas metálicas que actúan como ánodo y un cátodo. Los iones problema que penetran en la cámara, ionizan el gas creando electrones secundarios. Y gracias al campo eléctrico generado entre las placas, los iones son captados los ánodos. Los valores obtenidos por los ánodos corresponderán a la energía total depositada por el ion. En EMA se miden los cocientes isotópicos o proporciones entre un núcleo problema y los isótopos estables del mismo elemento, por ejemplo, ¹⁴C/¹²C. Como se mencionó anteriormente, los isótopos estables son analizados individualmente midiendo las corrientes generadas en las cajas de Faraday porque, por ejemplo, el ¹²C es 10¹²

más abundante. El sistema EMA instalado en el Laboratorio Nacional de Espectrometría de Masas con Aceleradores (LEMA) del Instituto de Física de la UNAM se ilustra en la Figura 13.



Figura 13. Esquema del sistema HV-AMS instalado en el LEMA. La zona de baja energía (1) consta de la fuente iones modelo SO110B y tiene una capacidad para 50 cátodos. El espectrómetro de masas de baja energía cuenta con un analizador electrostático a 54° y un analizador magnético a 90°. Prosigue el acelerador Tandetron de 1 MV (2) con los lentes Q-snout y Q-pole. La zona de alta energía (3) que consta de un analizador magnético a 90°, un deflector electrostático a 120°, y cajas

Faraday para la medición de isótopos estables como el ¹²C y ¹³C. El sistema de detección final también está en la zona de alta energía, que consta de un analizador electrostático y una cámara de ionización. La zona 4 es el sistema de computación por el cual se controlan parte de los sucesos en el sistema, y donde se obtienen los resultados para analizar.

3. Estructura y bioquímica dental

1. Estructura y tiempo de formación de dientes.

Las piezas dentarias pueden clasificarse de distintas formas [53]:

- De acuerdo a su permanencia en la cavidad bucal:
 - Dientes primarios, Deciduos o Temporarios:

Aparecen en la cavidad bucal entre los seis a ocho meses de vida postnatal y se completa la dentición alrededor de los tres años. Son veinte elementos dentarios, diez por cada arcada dentaria.

• Dientes permanentes (Figura 14):

Estos remplazan a los temporales a partir de los seis años y se completa (32 elementos) entre los 17 a los 21 años de edad. Estos no son reemplazados y su pérdida es definitiva.

- De acuerdo a su forma y función:
 - Incisivos:

Poseen bordes afilados tallados en bisel y se usan para cortar alimentos.

• Caninos:

De forma cónica que sirven para desgarrar.

• Premolares y molares:

Con superficies aplanadas que sirven para triturar y moler los distintos alimentos.

Los dientes constan de una corona y una raíz. La corona es la porción libre del elemento dentario que se encuentra en la boca. Raíz es la parte del diente que se inserta en el hueso alveolar y se fija al mismo por medio del ligamento periodontal (tejido conectivo).

El eje estructural de cada diente está formado por un tejido conectivo mineralizado denominado dentina. Rara vez se encuentra expuesta al medio bucal, ya que está cubierta en la zona de la corona por un tejido muy duro llamado esmalte. La dentina que se encuentra en la parte de la raíz está protegida por un tejido calcificado denominado cemento. La unión entre esmalte y dentina se conoce como conexión amelodentinaria y la unión entre cemento y dentina se denomina conexión cementodentinaria [53].



Figura 14. Odontograma. Se muestra la distribución de la dentición permanente, así como la forma de numerar a cada pieza dental



Figura 15. Esquema de las partes que componen a una pieza dental. Se distinguen las dos partes principales, corona y raíz. Se observan los nombres de otras partes que componen al diente.

Dentro de la dentina existe un espacio que recibe el nombre de cavidad o cámara pulpar. Esta cavidad contiene un tejido conectivo laxo que se denomina pulpa dentaria. La pulpa y la dentina forman una unidad estructural y funcional denominada complejo dentino-pulpar [53].

La necesidad de que el ser humano posea dos tipos de denticiones, se debe a que en el niño los maxilares son pequeños y el tamaño y número de dientes que puede alojar es limitado. En la segunda dentición el tamaño y número de elementos dentarios es mayor y está acorde con la dimensión alcanzada por los maxilares durante el crecimiento.

La cronología de formación y erupción dentaria permanente se detalla a continuación [54]:

Dientes maxilares								
Dentición permanente	Incisivo central	Incisivo lateral	Canino	Primer premolar	Segundo premolar	Primer molar	Segundo molar	Tercer molar
Calcificación inicial	3–4 m	10– 12 m	4–5 m	1.5–1.75 a	2–2.25 a	al nacer	2.5–3 a	7–9 a
Corona desarrollada	4–5 a	4–5 a	6–7 a	5–6 a	6–7 a	2.5–3 a	7–8 a	12– 16 a
Raíz desarrollada	10 a	11 a	13– 15 a	12–13 a	12–14 a	9–10 a	14–16 a	18– 25 a
Erupción dentaria	7-8 a	8-9 a	11-12 a	10-11 a	10-12 a	6-7 a	12-13 a	17-21 a
			Diente	es mandibula	ires			
Calcificación inicial	3–4 m	3–4 m	4–5 m	1.5–2 a	2.25–2.5 a	al nacer	2.5–3 a	8–10 a
Corona desarrollada	4–5 a	4–5 a	6–7 a	5–6 a	6–7 a	2.5–3 a	7–8 a	12– 16 a
Raíz desarrollada	9 a	10 a	12– 14 a	12–13 a	13–14 a	9–10 a	14–15 a	18– 25 a
Erupción dentaria	6-7 a	7-8 a	9-10 a	10-12 a	11-12 a	6-7 a	11-13 a	17-21 a

Tabla 1. Cronología de formación y erupción dentaria. Se muestra el tiempo aproximado deformación, desarrollo y erupción de cada pieza dental.

2. Composición química del esmalte

El esmalte es una matriz extracelular altamente mineralizada y de escaso metabolismo, se forma por síntesis y secreción de unas células llamadas ameloblastos, que desaparecen cuando el diente hace su erupción en la cavidad

bucal. Por este motivo biológicamente no puede repararse o autorregenerarse, como ocurre en los otros tejidos dentarios de naturaleza colágena. Al madurar, pierde tanto material orgánico como agua por lo que resulta un producto que está compuesto de un 96% en peso de material inorgánico, 3% de agua y 1% de material orgánico [55]. El principal material inorgánico es una apatita, la hidroxiapatita.

Las apatitas son estructuras iónicas con fórmula general de $Ca_{10}(PO_4)_6X$ (Figura 16), donde X a menudo es OH o F. La hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, es el fosfato de calcio más abundante en el reino animal por su relación con el fosfato básico de dientes y huesos. Por ser estructuras iónicas son sustancias bastante duras, refractarias, con puntos de fusión mayores a 1600°C [56]. Otra característica es el intercambio parcial o total de iones de la red cristalina por iones de tamaño similar.

El componente orgánico del esmalte maduro posee proteínas de naturaleza ácida, peso molecular bajo y composición compleja [56]. El esmalte externo tiende a contener menos proteínas que las regiones internas. La proteína en el esmalte externo es más soluble e incluye componentes ricos en glicina y de peso molecular bajo, y pequeños péptidos y aminoácidos [56]. Durante el desarrollo del esmalte, esta controla la nucleación y orientación de los cristales de apatita. En el esmalte maduro forma la matriz que embebe a estos cristales, dándole la resistencia a la fractura a este tejido.

El componente inorgánico del esmalte varia con la distancia a la superficie del diente. En el caso del calcio y del fósforo su concentración decrece, 33.6% y 39.4%, respectivamente, en la superficie hacia la unión amelodentinaria con un 16.1% y 18%; sin embargo, la proporción molar de estos componentes se mantiene constante (entre 1.62 y 1.78) [56].

Existe una fracción de carbono en el componente inorgánico en forma de carbonatos, constituyendo del 1.95 a 3.66% en peso [57]. El nivel de carbonato aumenta de la superficie hacia la unión amelodentinaria. La distribución de carbonatos se fija antes de que broten los dientes y no se afecta de forma importante por estar expuestos en la boca. El bajo contenido de carbonato de la región externa del esmalte puede ser consecuencia de la baja producción de CO2, debida a una actividad metabólica mas baja de los ameloblastos cerca del final de su lapso de vida.

37



Figura 16. Estructura de la hidroxiapatita. Una de las estructuras iónicas más duras presentes en el cuerpo humano. Este fosfato cristaliza en un sistema hexagonal; los parámetros de red son a=0.942 nm y c= 0.688 nm.

Existen otros elementos como sodio (0.25% a 0.90% en peso), magnesio (0.25% a 0.56% en peso), cloro (0.19% a 0.30% en peso), flúor (0.5%), (hierro (8 a 218 ppm) y algunos como zinc, plomo estaño, cobre y estroncio [56].

Debido a su alto contenido inorgánico el esmalte es susceptible a la desmineralización provocada por los ácidos, principalmente los que se generan por microorganismos producto de su metabolismo. No obstante, los iones flúor pueden sustituir a los grupos hidroxilo (uno cada cuarenta) en el cristal de hidroxiapatita y convertirlo en un cristal de fluorhidroxiapatita, lo que hace que la solubilidad de este cristal disminuya [56].

3. Composición química de la dentina

El tejido pulpar, ricamente vascularizado e inervado está constituido por diversos tipos de células, la más importante es el odontoblasto, el cual, es el responsable de formar y reparar la dentina. La dentina está constituida por fibras de colágeno y sustancia amorfa. Es un tejido mineralizado (70% de materia inorgánica) que se diferencia del esmalte, por ser un tejido dinámico (metabólicamente activo) lo que permite que se forme tejido dentinario durante toda la vida y que pueda reparase cuando sufre algún daño.

El mineral en la dentina y hueso es un fosfato cálcico apatítico cuyos cristales son mucho más pequeños que en el esmalte. No se conocen las funciones específicas de los componentes orgánicos en los tejidos calcificados, pero la del colágeno, que constituye hasta un 90% del material orgánico del hueso y dentina, es la de proporcionar fuerza tensil. Aunque se ha observado que el colágeno puede tener un papel importante en el proceso de mineralización [56]. El 10% restante del componente orgánico, comprende una serie de polímeros de proteínas y carbohidratos conocida en conjunto como *proteínas no colagenosas* que son de tipo aniónico y también pequeñas cantidades de lípidos y otras moléculas orgánicas.

El colágeno tiene una composición de aminoácidos poco común, una tercera parte es glicina, mientras que la prolina, hidroxiprolina y alanina conforman una décima parte cada una. La importancia de que el colágeno contenga prolina e hidroxiprolina radica en que sus átomos de nitrógeno no tienen un hidrógeno para la formación de puentes de hidrógeno, y también forman parte de un anillo heterocíclico voluminoso, de manera que no puede formarse una estructura de α-hélice. Las fibrillas de colágeno se forman de moléculas de tropocolágeno, la cual cada una de ellas está compuesta de tres cadenas de polipéptidos. Se han aislado varios polipéptidos diferentes, de varios tipos de colágeno que se han designado como I, II y III [56]. Casi 90% por peso de la dentina y del hueso está compuesto de colágeno tipo I. En la cámara pulpar existe colágeno tipo III.

Cada una de las tres cadenas polipeptídicas en la molécula de tropocolágeno se enrolla para formar una hélice que se dirige hacia la izquierda; las cadenas de polipeptídicas se extienden más que en la α -hélice. Las tres hélices se encuentran en forma paralela, unas con otras, con sus grupos terminales –NH2 del mismo lado, y tiene una ligera torsión que se dirige a la derecha para formar un cordón o una súper hélice. Los tres filamentos se mantienen unidos por puentes de hidrógeno. En la Figura 17 se muestra la composición del colágeno desde las cadenas de tropocolágeno hasta la fibra de colágeno.

Una de las características del colágeno maduro es su solubilidad en agua, la cual se debe al entrecruzamiento entre las cadenas α dentro de la molécula de tropocolágeno, y entre las moléculas adyacentes. El colágeno de la dentina es más difícil de disolver que el colágeno de los tejidos blandos, un efecto que se debe tal vez a una mayor unión cruzada. La unión cruzada consiste en formar ligaduras inter

39



Figura 17. Composición de la fibra de colágeno. Una de las proteínas estructurales más abundantes en el cuerpo humano. Esta proteína forma parte de las piezas dentales otorgando una matriz donde se depositan los cristales de hidroxiapatita.

e intramoleculares de residuos de lisina o hidroxilisina, que se encuentran en los extremos de las cadenas de tropocolágeno. Estas ligaduras proporcionan al colágeno su fuerza de tensión.

La fracción inorgánica de la dentina y hueso se compone de la siguiente forma. El contenido de magnesio de la dentina suele ser dos o tres veces más alto que en el esmalte o hueso. El contenido de carbonatos de la dentina es más alto que en el esmalte; sin embargo, es un poco menor que en el hueso [56]. El principal componente inorgánico de los tejidos mineralizados es un fosfato de calcio de apatita que guarda estrecha relación con la hidroxiapatita. Este fosfato de calcio es llamado bioapatita [58].

La bioapatita es similar, pero no idéntica, a la hidroxiapatita en la cual es posible la sustitución no estequiométrica. Los grupos fosfato son parcialmente reemplazados por carbonatos, así también los grupos hidroxilo son sustituidos por carbonatos [59]. Además de sustituir a los grupos fosfato y a los hidroxilos en la bioapatita, los carbonatos pueden ser adsorbidos en la superficie de los cristales [60]. La composición de la bioapatita puede describirse de manera aproximada con la siguiente fórmula [59]: (Ca, Na, Mg, Ba, Fe, Sr, Zn)₁₀(PO₄, HPO₄, CO₃)₆(OH, F, Cl, CO₃, O, H₂O)₂

4. Aplicaciones forenses del ¹⁴C

1. Generalidades

El objetivo de las sociedades actuales es conciliar la seguridad pública y respetar los derechos humanos de los gobernados. En nuestros días es necesario investigar y perseguir delitos en forma científica. Para esto se hace necesario el uso de las ciencias forenses, las cuales dan información a las autoridades encargadas de la procuración y administración de justicia, nuevas técnicas y métodos que permitan conocer la existencia o no del delito y del sujeto activo del mismo.

Cuando se menciona el término *forense* la mayoría de las personas piensa en cadáveres. Sin embargo, es necesario conocer la etimología de la palabra para establecer el campo de estudio y aplicación de las ciencias forenses. La palabra forense proviene del latín *forensis*: "perteneciente o relativo al foro". Cuando en la Antigua Roma la acusación, argumentación y pruebas de un crimen requerían ser presentadas en un foro ante personas consideradas notables, para que éstas determinaran el veredicto.

La Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México define las ciencias forenses como:

Un conjunto estructurado de conocimientos, de carácter científico, jurídico y técnico que se aplican al análisis de los hechos en materia de conflicto judicial y que permiten dar seguimiento y continuidad al proceso hasta que se presentan los resultados ante la autoridad jurídica correspondiente para coadyuvar en la procuración y administración de la justicia [61].

El hecho de que las ciencias tanto exactas como sociales apliquen y desarrollen nuevo conocimiento en el ámbito legal, da oportunidad de referirse a ellas como ciencias forenses.

La necesidad de técnicas exactas para estimar la edad ha aumentado por dos principales razones. La primera es el aumento de cadáveres y restos humanos no identificados; por otra parte, existen personas vivas que no cuentan con acta de nacimiento y, por tanto, no pueden comprobar su edad.

En muchos casos, basta con una estimación aproximada de la edad ya sea por parte de un experto en antropología o por el experto en odontología forense para confirmar la identidad de un fallecido con otros hallazgos. En otros casos la estimación de la edad debe ser lo más exacta posible, como en un caso de asesinato o un accidente donde no es posible tener más datos que permitan la identificación de una persona. Así, la estimación de la edad puede desempeñar un papel central en la aclaración de cuestiones con impacto jurídico o social tanto para un individuo como para la comunidad.

En este contexto la EMA y con apoyo de los registros de la concentración de ¹⁴C durante los años 50 y 60 provocados por el pico de la bomba, son una herramienta que permite establecer la fecha de nacimiento o muerte de un individuo a través del análisis de ¹⁴C en tejidos como sangre, uñas, cabello, huesos o dientes [62][63].

2. Determinación del tiempo de vida a través del contenido de ¹⁴C en dientes

El procedimiento estándar para determinar la edad de un cadáver sin identificar, es a través del estudio en dientes y huesos. Los métodos antropológicos, basados en la morfología de huesos y dientes no son precisos y pueden presentar incertidumbres de +/- 10 años [64]. Uno de los métodos más precisos para determinar la fecha de muerte de un individuo es la racemización del ácido aspártico. Este método se basa en la racemización del ácido aspártico que se acumula en los dientes durante el periodo de formación, el cual se convierte de la forma L a la forma D a una tasa ya determinada; el análisis se realiza mediante cromatografía de gases [65]. Este método se aplica con muestras como cemento, dentina o esmalte y su incertidumbre puede ser de +/- 5 años o menos [64].

El uso de dientes para determinar la fecha aproximada de muerte de individuos ha sido factible gracias al apoyo de la técnica de EMA. El procedimiento de análisis más sencillo requiere de la extracción del colágeno que forma parte de la dentina de la raíz del diente. Una vez extraída la proteína, esta se convierte en grafito que será analizado en el espectrómetro de masas con aceleradores. Cuando se obtiene la cantidad de ¹⁴C en la muestra, se compara con un curva de calibración y se obtiene la fecha en que el tejido intercambió carbono por última vez con el medio. La incertidumbre que se obtiene por este método es de aproximadamente 1.69 años [66].

En comparación, el análisis de 14C en esmalte dental es una técnica relativamente nueva (descrita por primera vez en 2005 [67]). El análisis de esmalte proporciona información sobre la fecha de nacimiento de una persona. El carbono que pueda extraerse para su análisis es el que se fijó al momento en que se formaron los dientes. Las formas en que el carbono se encuentra en los dientes van desde carbonatos atrapados en la estructura cristalina de la bioapatita o como sustituyente en este cristal. La incertidumbre a través de este método es similar al de un análisis de dentina, aunque un último reporte menciona que se obtuvieron 1.7 +/- 1.4 años de error [68].

Cuando se analiza un diente a través de la técnica de EMA surge una ambigüedad, que el resultado se encuentre en la parte creciente o decreciente del pico de la bomba. Para establecer cuál de las dos fechas es la más acertada, es necesario realizar un análisis tanto de esmalte como de dentina. El criterio es el siguiente: si existe mayor concentración de ¹⁴C en dentina que en esmalte, el diente corresponde a la parte creciente de la curva; en tanto que, si la dentina muestra una menor cantidad de ¹⁴C que en esmalte, la muestra pertenece a la parte decreciente de la curva.

5. Contexto social sobre el análisis de restos quemados

1. Accidentes.

Un accidente es un inesperado y catastrófico evento que resulta en heridas o la muerte de una o muchas personas [69]. Cuando sucede un evento de este tipo es necesario identificar a las víctimas con el fin de proveer la dignidad de un nombre a una persona fallecida, para permitir que los familiares comiencen procesos funerarios, para facilitar el proceso de investigación judicial, entre otros.

Un accidente puede ser por causas naturales (meteorológicas o eventos geológicos), de tipo tecnológico o causado por los seres humanos (fallas estructurales, fallas en medios de transporte, estampidas de gente, incendios, guerras y terrorismo).

Los accidentes pueden ser abiertos o cerrados, incluso una combinación de estos. Un accidente abierto es una situación donde no es posible identificar de manera inmediata a las víctimas, la única forma de obtener datos es por medio de registros ante-mortem. Un accidente cerrado es aquel dónde se tiene a la mano una lista de las posibles víctimas (por ejemplo, un accidente aéreo donde existe una lista de pasajeros) y, generalmente, los datos ante-mortem son más fáciles de obtener. Una combinación de accidentes cerrados y abiertos se da cuando el escenario donde se presenta el incidente es complicado, por ejemplo, un avión que se estrella en una zona residencial. Este tipo de eventos dificulta la recolección de datos ante-mortem.

En México las causas de muerte por accidentes ocupan más del 50% cuando se trata de defunciones accidentales y violentas, en esta categoría se incluyen homicidio con un 30% de incidencia en los últimos cinco años, y suicidio con una incidencia del 9% en los últimos dos años [70]. Cuando se trata de muertes por quemaduras es importante determinar si se produjeron pre o postmortem, la existencia de trauma previo a las quemaduras, por asfixia de gases o por aspiración de CO o por otra causa.

Las quemaduras pueden producirse por llama, por líquidos hirviendo, por contacto con un sólido, vapor o gases calientes, asociadas a explosiones o a sustancias químicas. Los eventos que presentan fuego de por medio van desde incendios forestales, casas en llamas, accidentes de automóvil hasta la incineración del cuerpo de una víctima. Las temperaturas que se alcanzan en cada una de las

situaciones van de 400 hasta los 1000°C, dependiendo de las condiciones de oxígeno y combustible presentes durante el fuego [71].

Cuando ocurre un incidente donde exista calor, ya sea por contacto directo con una flama o por la transferencia de energía a través de distintos medios, un cuerpo humano presenta cambios en su estructura. Los cambios van desde la deshidratación de los tejidos, desnaturalización de las proteínas hasta la combustión de las moléculas que conforman al individuo. Uno de los componentes del cuerpo humano que resiste a los efectos del calor son los dientes. Los dientes se componen principalmente de minerales, esta característica los hace resistentes, no solo al calor, sino también a álcalis y ácidos débiles.

2. Identificación de restos.

Las quemaduras son las lesiones producidas por la acción de una llama sobre los tejidos humanos. La etiología de las quemaduras habitualmente es accidental, siendo menos frecuente la causa homicida. Según Juan López-Palafox [72], algunos de los cadáveres carbonizados de etiología homicida fueron asesinados mediante otros procedimientos, antes de ser incinerados. Con frecuencia se investigan víctimas que han sido rociadas con gasolina, muriendo por la acción del fuego. Este procedimiento lo usan grupos delincuenciales concretos con el objetivo de borrar cualquier dato de identificación de las víctimas.

La dificultad que encierra la investigación de cuerpos carbonizados obliga a ensayar procedimientos específicos, destacando estudios dentales, ya que son los elementos que se recuperan sin haber sufrido cambios estructurales tan drásticos.

Los cuerpos carbonizados presentan ciertas características que de alguna manera dificultan el análisis en el proceso de identificación. Estas características son [72]:

- Reducción de volumen de órganos y miembros que les hace parecer más jóvenes.
- Los huesos se separan a nivel de las articulaciones, hallándose frecuentemente fracturados y carbonizados.
- Los miembros y manos se acortan, de dos a tres veces con respecto a su tamaño natural.
- La cabeza de un adulto llega a revestir la apariencia de la de un niño de siete a doce años.

 Cuando la intensidad del fuego es alta, al intentar examinar los restos, estos pueden convertirse en cenizas. En estos casos desaparecen datos de información, como son ropa, documentación y otros objetos.

Algunos reportes mencionan que la identificación basada en la odontología, va del 43 al 83% de efectividad [69]. La odontología forense contribuye en el proceso de identificación como método secundario o de soporte donde los registros de las personas son inadecuados o no existen. La identificación se basa en la comparación de los registros dentales post-mortem con los registros ante-mortem que se tengan. Sin embargo, cuando no hay registros iniciales disponibles, como cuando no hay un nombre para un individuo, entonces las características de las estructuras orodentales se pueden utilizar para indicar la edad, el sexo, la historia médica o dental, etc.

En accidentes donde se presenta fuego la escena se modifica, así como también se modifican los restos que pueden ser utilizados para determinar la edad de una persona. Los dientes, especialmente los molares, tienen una alta resistencia y sus materiales se preservan incluso tras un evento donde haya fuego moderado. Los métodos morfológicos pueden ser aplicados solamente en casos donde el diente se ha preservado por completo. El método de racemización del ácido aspártico no puede utilizarse en accidentes que involucran fuego ya que el proceso de racemización es dependiente de la temperatura: el calor induce a una mayor producción de ácido aspártico dando lugar a falsos positivos.

Se están desarrollando métodos que apoyen a las técnicas habituales de identificación y determinación de la edad . El contenido de los dientes, colágeno en dentina, bioapatita en esmalte o proteínas de la pulpa, ha comenzado a ser usado para determinar la edad o el parentesco de las personas por medio del análisis de ¹⁴C o del DNA, respectivamente [73]. El análisis de restos que fueron sometidos al fuego se encuentra poco desarrollado. Existe la posibilidad de analizar DNA de una muestra quemada pero sólo hasta cierta temperatura, la razón es que la pulpa dental contiene información genética termolábil que se encuentra protegida por la dentina y ésta a su vez por los tejidos en los que se encuentra inmerso el diente. Cuando las temperaturas a las que fue sometido un cuerpo sobrepasan los límites para realizar un análisis de DNA, es necesario acudir a otros compuestos químicos que soporten la energía calorífica y que puedan ser utilizados para proporcionar información forense.

3. Pregunta de investigación y objetivos

Pregunta de investigación

¿De qué manera influyen factores como la temperatura de calcinación y tipo de diente en la determinación de la fecha aproximada de nacimiento de una persona por medio del contenido de ¹⁴C?

Objetivo General

Reproducir la fecha de nacimiento de diferentes personas de edades conocidas a través del contenido de ¹⁴C en piezas dentales con la técnica de Espectrometría de Masas con Aceleradores.

Objetivos particulares

- Desarrollar la metodología a seguir para analizar el esmalte dental dañado por el fuego, y así, obtener la fecha de nacimiento.
- Determinar el límite de temperatura hasta el cual es posible obtener resultados confiables por medio de la técnica EMA.
- Determinar cuáles piezas dentales son las que proporcionan resultados más exactos de acuerdo a su tiempo de formación y contenido de ¹⁴C.

Hipótesis

Si la concentración de ¹⁴C se distribuye en todo el mundo de acuerdo a las investigaciones realizadas y, además, se metaboliza de la misma manera que el ¹²C, será posible determinar la edad de las personas nacidas entre 1950 y 1990 por el contenido de ¹⁴C en tejidos blandos, así como en minerales como el esmalte dental.

4. Materiales y métodos

Muestras dentales

Los dientes utilizados fueron donados por la Facultad de Medicina de la UNAM, a través de la carrera en Ciencia Forense por el laboratorio de antropología y odontología forense. A las muestras se les asignó un número de registro y se incluyó en el inventario del LEMA para darles rastreabilidad. La información de las muestras se muestra en la Tabla 2.

Registro LEMA	Тіро	Año de nacimiento
831	Tercer molar	1974
832	Tercer molar	1974
833	Tercer molar	1974
834	Primer premolar	1991
835	Primer premolar	1991
836	Primer premolar	1991
837	Tercer molar	1976
838	Tercer molar	1976
839	Tercer molar	1976

 Tabla 2. Registro de las piezas dentales con clave asignada en el LEMA. Se muestra tipo de diente y fecha de nacimiento real.

Todas las muestras se limpiaron con ultrasonido utilizando un sonicador marca Cole-Parmer modelo 08895-02 en agua desionizada durante 15 minutos hasta que los restos de suciedad, por sangre, residuos de tejido y materiales orgánicos e inorgánicos adheridos se eliminó.

Tratamiento de muestras

Para someter las muestras a las condiciones de temperatura de análisis, se utilizó un horno eléctrico cilíndrico. El horno consta de un tubo cerámico rodeado de una resistencia. La resistencia está cubierta con fibra de vidrio. Tanto el tubo cerámico como resistencia y fibra de vidrio, las envuelve una estructura de aluminio (Fotografía 1).

En un costado del horno se colocó una pieza de material refractario, que funcionó como aislante entre el horno y un tubo de vidrio el cual se alimentó con nitrógeno



Fotografía 1. Horno eléctrico cilíndrico. Se observa el tubo cerámico al centro en el cual se introdujeron las muestras para su calcinación.

gaseoso marca Infra con una pureza del 99.995% con el objetivo de mantener una atmosfera inerte durante el proceso de calcinación.

Para controlar la temperatura del horno se utilizó un reóstato marca TENMA modelo 72-110. Con él era posible alcanzar temperaturas de hasta 1100°C. La temperatura se monitoreó con la ayuda de un termopar, el cual se conectó al módulo National Instruments FP-1000. El modulo se conectó a una computadora y se visualizó la temperatura con el software LabView 2009.

Las temperaturas experimentales fueron 500, 600 y 700°C. En la Tabla 3 se muestra el diseño experimental.

Muestra	Condiciones
831	500°C
832	500°C
833	Control
834	Control
835	700°C
836	700°C
837	Control
838	600°C
839	600°C

 Tabla 3. Diseño experimental para cada pieza dental.

Las muestras se colocaron sobre una pieza de alúmina para evitar el contacto de las piezas dentales con las paredes internas del horno y que resultaran contaminadas o se adhirieran a las mismas. Para cada temperatura ensayada, se introdujeron dos muestras. En cada una de las temperaturas se utilizaron rampas de calentamiento de 9°C/min para llegar a 500°C, 12°C/min para alcanzar 600°C y 13°C/min para llegar a los 700°C. Una vez alcanzada la temperatura, esta se mantuvo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se apagó el horno y se dejó enfriar hasta la temperatura del ambiente. Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico con cierre hermético y se llevaron al laboratorio de preparación de muestras.

Corte de piezas dentales

A los controles se les realizó un corte transversal, con ayuda de un micromotor (MDC modelo dental 3) y disco de diamante de una luz (modelo NTI) de modo que la corona se separó de la raíz. A las muestras quemadas se les separó la corona de la raíz con ayuda de pinzas de disección. La raíz de todas las muestras se guardó. Las muestras tanto quemadas como controles se depositaron en tubos de polipropileno de fondo cónico. Todas las coronas dentales se sonicaron en agua desionizada durante 15 minutos. Posteriormente fueron ingresadas en una estufa Barnstead (Lab-Line modelo 3512) a 65°C durante aproximadamente 48 horas, para que se secaran por completo.

Tratamiento de muestras

A las muestras secas se les agregaron 7 mL de NaOH 10M. Los tubos se colocaron en un bloque de calentamiento a 65°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, las muestras se sonicaron a 60°C durante 30 minutos. La solución de cada tubo se decantó. Posteriormente se añadieron 7 ml de NaOH 10M y se dejó, nuevamente, en el bloque de calentamiento. Este procedimiento se repitió durante una semana. Luego, las muestras se lavaron varias veces con HCI 0.2M y agua desionizada hasta que se alcanzó un pH neutro. Los tubos se ingresaron en la estufa Barnstead a 65°C durante 48 horas, para secar las piezas dentales. Con ayuda de una espátula, se eliminaron los restos de dentina que quedaban adheridos a la superficie del esmalte. Las muestras se llevaron a sonicar en agua desionizada durante 15 minutos. Posteriormente, se dejó secar las muestras a 65°C durante 48 horas.

Digestión de carbonatos

El siguiente paso consistió en pesar las muestras y colocar las muestras de esmalte dental en tubos de borosilicato con tapa septum (Labco Exteiners). La cantidad mínima necesaria para obtener 1mg de grafito debe ser de 300 mg de esmalte.

Los tubos se colocaron en el bloque de calentamiento del equipo para la hidrólisis de carbonatos (*Carbonate Handling System*: CHS; IonPlus). El equipo consta de un muestreador automático, trampa de agua y adaptador de flujo de helio mostrado en la Fotografía 2. Este sistema CHS está acoplado a un equipo de grafitización automatizado (AGE III; IonPlus) como el que se muestra en la Fotografía 3 [74].

A los tubos con las muestras de esmalte se les agregó 1mL de disolución de H_3PO_4 al 85%. Se dejó reaccionar durante una hora a una temperatura de 80°C. La reacción que describe el proceso anterior es la siguiente:

 $2H_3PO_4 + 3CaCO_3 \rightarrow 3CO_2 + 3H_2O + Ca_3(PO_4)_2$

El CO₂ que se generó se desplazó al reactor del grafitizador AGE III utilizando helio como gas acarreador [74].

Grafitización

El CO₂ que se obtuvo de cada muestra se transportó desde el sistema CHS hasta el AGE III con ayuda de helio marca Infra con una pureza del 99.999%. Durante el proceso los gases son adsorbidos en una trampa de zeolita tipo 13X $(Na_{86}[(AIO_2)_{86}(SiO_2)_{106}]^*H_2O)$. Para que el CO₂ se libere es necesario calentarla a 490°C, posteriormente se limpia y se enfría con H₂ para que el proceso se lleve a cabo nuevamente.

El sistema AGE III cuenta con siete reactores, en cada uno se encuentra un tubo al que se deben

agregar aproximadamente 4.5mg de hierro metálico en polvo marca Alfa Aesar con número de malla 325. La superficie del hierro es oxidada utilizando oxígeno e incrementando la temperatura, con el propósito de eliminar cualquier contaminante orgánico adherido. Posteriormente es reducido nuevamente a hierro utilizando una corriente de H₂ (marca Infra y con pureza del 99.999%) y temperatura.



Fotografía 2. Equipo automatizado para la hidrólisis de carbonatos CHS lonPlus.



Fotografía 3. Equipo automatizado de grafitización AGE III IonPlus.

El hierro en su forma elemental sirve como catalizador en una reacción de reducción del $CO_{2(g)}$ obtenido de las muestras de esmalte y H₂. Las condiciones para que se lleve a cabo la reacción son 580°C durante dos horas. El producto principal de la reacción es grafito, el cual es analizado en el separador isotópico. La reacción anterior se conoce como reacción de Bosch [75], [76] y la ecuación que la describe es la siguiente:

$$CO_2 + H_2 \rightarrow CO + H_2 + H_2O \rightarrow C + H_2O$$

Para que la reacción sea más eficiente es necesario desplazar el equilibrio hacia la formación de productos. Una manera de hacerlo es congelando el agua a -10°C por medio de enfriadores tipo Peltier [76]. De esta forma se hace más eficiente la obtención de grafito. El proceso de tratamiento de las muestras de dientes y de grafitización se esquematizan en el diagrama de la Figura 18.



Figura 18. Diagrama de flujo para el pretratamiento y grafitización de carbonatos.

Prensado de muestras

El carbono en forma de grafito se deposita en el hierro; para introducirlo al separador isotópico es necesario introducirlo a un cátodo de aluminio. Con ayuda de

una prensa hidraulica la cual ejerce una presión de 150 psi, el grafito se coloca en un cátodo de aluminio. Esto se hace para obtener una superficie lisa y homogenea. Una vez que el cátodo contiene el grafito, este se coloca en un portacátodos y a continuación se introduce en un carrusel que será analizado en el espectrómetro de masas con aceleradores.

Reporte de medidas de ¹⁴C

Los resultados que arroja el espectrómetro de masas con aceleradores son reportados como la razón entre ${}^{13}C/{}^{12}C$ y ${}^{14}C/{}^{12}C$.

Es indispensable tener en cuenta el fraccionamiento isotópico, ya que de aquí se pueden realizar correcciones en la muestra medida, asi como identificación de la dieta, incluso de la zona geográfica donde vivía el organismo.

Calibración de resultados

Para las muestras modernas, es decir, las muestras analizadas despues del pico de la bomba es posible procesarlas con un software en linea llamado Calibomb.

Calibomb es una herramienta de uso no comercial disponible en linea a través de la página http://calib.qub.ac.uk/CALIBomb/ desarrollada por Reimer [44], en donde se debe elegir una de las zonas de distribución de ¹⁴C [32], de acuerdo al orígen de la muestra; para las muestras recolectadas en México les corresponde la zona 2. Gracias a que se han hecho mediciones de ¹⁴C en anillos de crecimiento de árboles, el programa Calibomb es especial para muestras que se formaron años antes, durante y despues de las pruebas nucleares que dieron lugar al pico de la bomba.

La precisión en la calibración depende de la calidad de los resultados obtenidos por EMA, asi como de la correpondencia entre la cantidad de ¹⁴C y la pendiente de la curva de calibración.

Para conocer la edad calendario de las muestras es necesario introducir la cantidad de ¹⁴C en al muestra en unidades de fracción moderna (Fm). También se necesita introducir el error, este tambien posee unidades de fracción moderna. Basta con presionar el boton de "Calibrate", en la interfaz gráfica, para obtener las posibles edades calendario de las muestras, asi como un gráfico que muestra la distribución de probabilidad de los posbles años que corresponden al nivel de ¹⁴C medido.

5. Resultados y discusión

Tratamiento de muestras

Las condiciones de temperatura a las que se sometieron los las piezas dentales, se eligieron tomando en cuenta dos criterios; uno social y otro fisicoquímico. Desde el puento de vista social el rango de temperatura elegido, es decir, de los 500°C a los 700°C comprende situaciones que van desde desde una fogata, una casa en llamas y un automóvil incendiandose, según describe Ellingham [71].

Fisicoquímicamente, como describe Reyes-Gasga [77] y Munro et al. [78], desde los 275°C y hasta los 500°C se pierde toda la materia orgánica presente en las piezas dentales. Desde los 100°C y hasta los 600°C el agua que que forma parte de las piezas dentales se pierde. A los 700°C comienza la perdida de carbonatos tanto los que se encuentran adsorbidos como los que forman parte de la estructura cristalina de la bioapatita.

Con estas condiciones se intentó comprobar el máximo de temperatura a la cual es posible obtener resultados confiables en cuanto a fechas de nacimiento de personas a través de la concentración de ¹⁴C en dientes. En el aspecto social se intentaron abarcar los escenarios más recurrentes cuando se presenta un accidente que involucre fuego. Desde el puento de vista fisicoquímico se elegieron los rangos de temperatura donde se presenta la mayor cantidad de cambios macroscópicos y químicos.

Descripción visual de las muestras carbonizadas

Una vez incineradas las piezas dentales, se corroboró lo descrito según Sandholzer [79]. El autor menciona que es posible determinar las temperaturas aproximadas a las que fueron sometidas las muestras con la coloración de estas. Un color café y negro, indica que las muestras se sometireron a temperaturas alrededor de 400°C. Una coloración café con una dismunución del negro, indica que las muestras fueron expuestas a 500°C. Conforme el color café disminuye y, a su vez, aumenta una coloración grisácea blanca, indica un aumento en la temperatura. Lo anterior se explica por la disminución del contenido de material orgánico; paralelmente la estructura cristalina de la bioapatita se ve detriorada al aumentar la temperatura.

Para confirmar lo anterior se recurrió al uso de espectroscopía Raman. Esta técnica se basa en la dispersión de la luz por acción de las especies presentes. El hindú C.

V. Raman descubrió que la longitud de onda de una pequeña fracción de la radiación dispersada por ciertas moléculas, difiere del haz incidente y los desplazamientos de longitud de onda dependen de la estructura química de las moléculas responsables de la difracción. Esta técnica comparte longitudes de onda del infrarrojo medio y en ocasiones los espectros de absorción se parecen para algunas especies; no obstante, una de las ventajas de los espectros Raman respecto al infrarrojo es el hecho de que el agua no interfiere, de este modo se pueden obtener espectros Raman de disoluciones acuosas.

El análisis espectroscópico se realizó en el laboratorio de Espectroscopía Óptica ubicado en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada en Juriquilla, Querétaro. En el anexo 1 se encuentran los resultados del análisis.

Las piezas dentales se muestran en la Tabla 4. Se nota cómo a mayor temperatura, la coloración café disminuye y, a su vez, las piezas adquieren un color grisáceo.

Tratamiento químico y grafitización

El tratamiento en hidróxido de sodio 10N se realizó con la finalidad de eliminar todo rastro de materia orgánica remanente en las muestras. En el caso de los controles, la disolución de NaOH contribuyó a remover el colágeno presente en la corona dental. La hidroxiapatita que conforma a la corona, es insoluble a pH básicos. En la Fotografía 4 se muestra un tubo de plástico con muestra dental y que ya fue tratada con hidróxido de sodio 10M.

Las ventajas del uso del equipo para la hidrólisis de carbonatos son que permite adicionar de manera automatizada ácido fosfórico a las muestras. El uso de trampas de Sicapent con indicador marca Merck permite eliminar la humedad. El CO₂ generado no requiere de tratamientos extra.

El CHS se opera a través de una computadora con el software proporcionado por la empresa fabricante lonPlus. El software permite controlar la adición del ácido fosfórico, así como la recolección del gas generado con ayuda de una aguja de doble pared, que por una parte inyecta helio como gas acarreador y por otra, recolecta el gas generado por la reacción. También es posible monitorear el proceso de la reacción de Bosch, desde el acondicionamiento del equipo hasta la obtención de grafito. En la Figura 19 se muestra el proceso de recolección de dióxido de carbono, acondicionamiento con hidrógeno y su grafitización.



Fotografía 4. Tubos de plástico con una pieza dental cada uno. La pieza se trató químicamente y el siguiente paso es la hidrólisis para su posterior grafitización.



Figura 19. Proceso de grafitización en el software proporcionado por IONPlus. Se observan tres etapas, la primera es el acondicionamiento del hierro. En la segunda etapa se cargan los reactores

con el dióxido de carbono recolectado. En la tercera etapa se observa la disminución de la presión por el proceso de grafitización.

TEMPERATURA

MUESTRA



Tabla 4. Dientes calcinados a diferentes temperaturas. Se observan fotografías de las piezasdentales después de haber sido tratadas con calor.

Cantidad de ¹⁴C en las muestras

Tras el análisis del grafito a través del espectrómetro de masas con aceleradores, se obtuvieron los siguientes resultados de ¹⁴C para cada una de las muestras:

Muestra	Tipo de diente	Fm	Error Fm
831	Tercer molar	116.00	0.41
832	Tercer molar	115.10	0.80
833	Tercer molar	117.36	0.47
834	Primer premolar	115.95	0.45
835	Primer premolar	114.81	0.47
836	Primer premolar	47.09	0.23
837	Tercer molar	101.58	0.39
838	Tercer molar	112.49	0.39
839	Tercer molar	112.87	0.38

Tabla 5. Resultados de la concentración de ¹⁴C dada en Fm.

Se realizó una prueba ANOVA para establecer si existe diferencia significativa entre la concentración de ¹⁴C de cada tratamiento de temperatura. Los datos se consideraron de la siguiente manera:

Tratamiento	500	700	600	Control
M1	116.01	114.82	112.49	117.36
M2	115.10		112.87	115.95
М3				101.58
Suma de cuadrados	231.11	114.82	225.37	334.90
Muestras	2	1	2	3

Tabla 6. Tabla de datos para ANOVA. Se presenta la concentración de ¹⁴C de cada tratamiento.

Para el tratamiento de 700°C sólo se tomó en cuenta un dato, debido a que la diferencia a simple vista es muy grande. El análisis de varianza, por tanto, se realizó con los resultados que se comportan de manera normal; en el análisis se incluyeron los controles para determinar si existe diferencia significativa.

Fuente de variación	SC	GL	Media C	F °calc.
Entre tratamientos	21.58	3	7.19	0.28
Dentro de tratamientos	152.98	6	25.49	
Total	174.55	9		F. de tablas: 4.76

Tabla 7. Tabla ANOVA

La hipotesis nula para este análisis es: no hay diferencia significativa en la cantidad de ¹⁴C en las muestras, tanto control, como tratadas.

La hipotesis alterna es: existe diferencia significativa en la concentración de ¹⁴C tanto en controles como en muestras tratadas.

El resultado muestra que la F calculada es menor a la F de tablas, por tanto, la hipotesis alterna se rechaza y se concluye que no hay diferencia significativa en la concentración de ¹⁴C en las muestras.

Las unidades que con que se reporta la cantidad de ¹⁴C en las muestras es la fracción moderna, esta unidad permite comparar los registros de carbono atmosférico y realizar una calibración para conocer el periodo de tiempo al que pertenecen las muestras.

Calibración de las muestras

Con la concentración de ¹⁴C de cada una de las muestras, expresada en Fm, es posible obtener el periodo en el que a las muestras dentales se formaron. Para esto es necesario utilizar el software en línea Calibomb. Una vez introducidos los datos requeridos por el programa, se muestran intervalos de tiempo, así como la probabilidad de que la muestra pertenezca a alguno de los intervalos calculados.

De las muestras dentales se obtuvieron los siguientes intervalos de tiempo:

En las Figuras 20 a 28, se presentan los intervalos calculados por Calibomb de acuerdo a la Fm, de cada muestra.



Figura 20. Intervalo calibrado de la muestra 831.



Figura 23. Intervalo calibrado de la muestra 834.



Figura 26. Intervalo calibrado de la muestra 837



Figura 21. Intervalo calibrado de la muestra 832.



Figura 24. Intervalo calibrado de la muestra 835.



Figura 27. Intervalo calibrado de la muestra 838.



Figura 22. Intervalo calibrado de la muestra 833.



de la muestra 836.



Figura 28. Intervalo calibrado de la muestra 839.

Figura 25. Intervalo calibrado



Muestra	Fm	Error Fm	Periodo de tiempo calibrado	Probabilidad (%)
			1958.86 – 1959.01	9.8
831	116.00	0.41	1987.93 – 1987.95	0.1
007	110.00	0.41	1988.81 – 1990.99	86.2
			1991.41 – 1991.95	3.9
			1958.11 – 1958.94	8.2
832	115.10	0.80	1988.84 – 1988.93	0.6
			1989.19 – 1993.53	91.2
			1958.40 – 1959.11	8.0
			1985.83 – 1985.91	0.7
833	117.36	0.47	1986.24 – 1986.33	0.8
			1986.94 – 1987.38	5.6
			1987.76 – 1990.11	85.0
			1958.18 – 1959.02	9.9
			1987.93 – 1987.96	0.1
834	115.95	0.45	1988.36 – 1988.37	<0.1
			1988.81 – 1991.15	84.2
			1991.38 – 1991.98	5.7
835	114 81	0 47	1958.18 – 1958.83	6.9
		0111	1989.90 – 1993.04	93.1
836	47.09	0.23	5053 AC- 4900 AC	100
837	101.58	0.39	1955.45 – 1956.16	100
			1957.92 – 1958.56	5.8
838	112.49	0.39	1992.09 – 1992.22	1.0
			1993.06 – 1996.20	93.2
			1957.96 – 1958.61	6.2
839	112.8741	0.38	1992.05 – 1992.38	4.1
			1992.90 – 1995.95	89.8

Tabla 8. Intervalos de tiempo calibrados. Se muestran las muestras, así como la Fm y los intervalosde tiempo calibrados a través del software en línea Calibomb.

Como se observa en la tabla 8, se obtienen intervalos de tiempo cercanos para cada muestra; para algunas muestras la probabilidad es de 100%. La probabilidad de que la muestra pertenezca a cierto periodo depende de la pendiente de la curva; cuando la pendiente es más alta para cierta concentración, la probabilidad de que sea el intervalo aumenta, por el contrario, cuando la pendiente es cercana a cero existe una mayor incertidumbre sobre el periodo correcto al que pertenecen las muestras.

La muestra 836 presenta resultados anormales. La edad que calcula el software Calibomb, la hace de acuerdo a la cantidad de ¹⁴C presente en la muestra. Este resultado anómalo puede generarse por la pérdida de gas durante la transferencia desde el sistema de manejo de carbonatos (CHS) hasta los reactores del sistema automatizado de grafitización (AGE). Los otros resultados, no presentan diferencia

significativa en la concentración de ¹⁴C; aun cuando la temperatura máxima alcanzada fue de 700°C, punto en el cual la hidroxiapatita comienza a recristalizar y a perder carbonatos que son parte de la red cristalina, así como de carbonatos adsorbidos en la superficie.

La siguiente Tabla (9) muestra la edad de nacimiento real, obtenida por parte de los donadores, así como la edad calculada a través del contenido de ¹⁴C en las piezas dentales.

Muestra	Tratamiento	Año de nacimiento	Periodo de tiempo calibrado	Probabilidad (%)
			1958.86 – 1959.01	9.8
021	500	1074	1987.93 – 1987.95	0.1
831	500	1974	1988.81 – 1990.99	86.2
			1991.41 – 1991.95	3.9
			1958.11 – 1958.94	8.2
832	500	1974	1988.84 – 1988.93	0.6
			1989.19 – 1993.53	91.2
			1958.40 – 1959.11	8.0
			1985.83 – 1985.91	0.7
833	Control	1974	1986.24 – 1986.33	0.8
			1986.94 – 1987.38	5.6
			1987.76 – 1990.11	85.0
			1958.18 – 1959.02	9.9
			1987.93 – 1987.96	0.1
834	Control	1991	1988.36 – 1988.37	<0.1
			1988.81 – 1991.15	84.2
			1991.38 – 1991.98	5.7
025	700	1001	1958.18 – 1958.83	6.9
655	700	1991	1989.90 – 1993.04	93.1
836	700	1991	5053 AC- 4900 AC	100
837	Control	1976	1955.45 – 1956.16	100
			1957.92 – 1958.56	5.8
838	600	1976	1992.09 – 1992.22	1.0
			1993.06 – 1996.20	93.2
			1957.96 – 1958.61	6.2
839	600	1976	1992.05 – 1992.38	4.1
			1992.90 – 1995.95	89.8

Tabla 9. Fechas de nacimiento real y fechas calibradas.

En la siguiente Tabla (10) se muestra el tipo de diente, año de nacimiento real y la edad calculada con la mayor probabilidad:

Muestra	Tipo de diente	Año de nacimiento	Periodo de tiempo calibrado
831	Tercer molar	1974	1988.81 – 1990.99
832	Tercer molar	1974	1989.19 – 1993.53
833	Tercer molar	1974	1987.76 – 1990.11
834	Primer premolar	1991	1988.81 – 1991.15
835	Primer premolar	1991	1989.90 - 1993.04
836	Primer premolar	1991	5053 AC- 4900 AC
837	Tercer molar	1976	1955.45 – 1956.16
838	Tercer molar	1976	1993.06 – 1996.20
839	Tercer molar	1976	1992.90 – 1995.95

Tabla 10. Comparación entre la edad real y el intervalo de tiempo con mayor probabilidad.

En la Tabla 10, se observa cómo pareciera no corresponder el año de nacimiento de la persona que donó las muestras, con la edad calculada. Sin embargo, es necesario considerar el tiempo de retraso de formación conforme a la pieza dental. De acuerdo con N. Ash [54] el retraso de formación dental es de la siguiente manera:

Muestra	Tipo de diente	Año de nacimiento	Retraso de formación	Periodo de tiempo calibrado
831	Tercer molar	1974	12 – 16 años	1988.81 – 1990.99
832	Tercer molar	1974	12 – 16 años	1989.19 – 1993.53
833	Tercer molar	1974	12 – 16 años	1987.76 – 1990.11
834	Primer premolar	1991	5 – 6 años	1988.81 – 1991.15
835	Primer premolar	1991	5 – 6 años	1989.90 – 1993.04
836	Primer premolar	1991	5 – 6 años	5053 AC- 4900 AC
837	Tercer molar	1976	12 – 16 años	1955.45 – 1956.16
838	Tercer molar	1976	12 – 16 años	1993.06 – 1996.20
839	Tercer molar	1976	12 – 16 años	1992.90 – 1995.95

Tabla 11. Intervalo de tiempo que debe considerarse de acuerdo al tipo de diente.

Muestra	Año de nacimiento	Retraso de formación	Intervalo generado	Periodo de tiempo calibrado
831	1974	12 – 16 años	1986 - 1990	1988.81 – 1990.99
832	1974	12 – 16 años	1986 - 1990	1989.19 – 1993.53
833	1974	12 – 16 años	1986 - 1990	1987.76 – 1990.11
834	1991	5 – 6 años	1996 - 1997	1988.81 – 1991.15
835	1991	5 – 6 años	1996 - 1997	1989.90 – 1993.04
836	1991	5 – 6 años	1996 - 1997	5053 AC- 4900 AC
837	1976	12 – 16 años	1988 - 1992	1955.45 – 1956.16
838	1976	12 – 16 años	1988 - 1992	1993.06 – 1996.20
839	1976	12 – 16 años	1988 - 1992	1992.90 – 1995.95

Considerando la información anterior es posible generar un intervalo de tiempo por efecto del retraso en la formación dental:

Tabla 12. Ajuste de la edad calibrada

Con la información de la génesis de esmalte, los intervalos calculados son más cercanos a la edad real de la persona. Sin embargo, la diferencia entre la edad real y la edad calculada es amplia. El hecho de tener como muestras piezas dentales anteriores, aumenta la incertidumbre de la determinación de la edad. Para minimizar el error, es recomendable utilizar dientes con periodo de formación de la corona cortos; por ejemplo, primeros molares e incisivos centrales y laterales. Aunque existe un inconveniente, estas piezas dentales son pequeñas y la cantidad de carbono total podría no ser suficiente para tener resultados satisfactorios. La recomendación es usar dientes con tamaño suficiente, pero que no tengan intervalos de formación amplios; tales muestras serían primeros molares y primeros premolares. En un caso real es difícil que se recuperen las muestras que proporcionan mejores resultados, sin embargo, hay que adecuarse a las circunstancias y tener bien identificadas los tiempos de formación de las muestras.

En la Figura 29, se muestra la correlación entre la edad calculada y la edad real de las muestras.


Figura 29. Correlación de fechas. La correlación entre las fechas de nacimiento real y calculada son altas; excepto para la muestra 837, la cual presentó problemas durante el proceso de hidrólisis y grafitización.

Las muestras sometidas a 500°C presentan resultados muy cercanos a los reales, se observa en la Figura 29 que la variación entre las muestras y el control es mínima. La desviación estándar entre muestras es de 1.03 años, mientras que el resultado calculado se encuentra dentro del intervalo ajustado. Por lo que los resultados son confiables.

Las muestras sometidas a 600°C presentan una anomalía. El control arroja resultados fuera de especificación; sin embargo, las dos muestras tratadas tienen una desviación de dos años entre la edad real y la edad calculada a través de ¹⁴C. Para evitar resultados fuera de especificación es necesario cerciorarse de que todos los equipos se encuentren funcionando de manera correcta y no presenten fugas, así como las agujas que recolectan el gas, que estas no se encuentren tapadas por restos de septum. Aunque la desviación estándar entre muestras es de 0.14, el resultado calculado se encuentra por debajo del intervalo ajustado presentando una diferencia de 2 años.

Las muestras tratadas a 700°C presentan muchas anomalías que pueden deberse a la influencia de factores como la temperatura y los equipos. En cuestión de temperatura, a partir de los 700°C la concentración de carbonatos presentes en el esmalte, tanto adsorbidos como parte de la estructura cristalina de la hidroxiapatita, se pierden.

En un principio la bioapatita se daña y al aumentar la temperatura favorece la recristalización del mineral, haciéndolo más estable y llegando a la estequiometría de una hidroxiapatita pura. Sin embargo, en este estudio, se comprobó por medio de la técnica de espectroscopía Raman que la hidroxiapatita no alcanzó a recristalizarse.

Tratando el tema de los equipos, es conveniente realizar algunas pruebas de recolección del gas, así como la limpieza antes y después de utilizar las agujas y jeringas que conforman el equipo de manejo de carbonatos.

Para las muestras tratadas a 700°C se toman en cuenta el control y sólo una muestra. En estas se observa una diferencia de casi cinco años por debajo del intervalo ajustado.

Los resultados de las muestras tratadas a más de 600°C comienzan a ser menos confiables. La cantidad de ¹⁴C se modifica in situ, es decir, durante el proceso de calcinación se producen una serie de fenómenos fisicoquímicos que modifican la cantidad de carbono en el esmalte.

Existen factores de fondo, tales como el fraccionamiento isotópico debida a la dieta, así como la región donde vive cada individuo. La dieta modifica la cantidad de isótopos que ingresan al cuerpo humano, si la ingesta de comida es principalmente del mar, la cantidad de átomos pesados como ¹³C y ¹⁴C se favorece.

La región donde vive una persona influye de manera tal que, si es de ciudad, el efecto Suess se hace presente en mayor medida y diluye la concentración de átomos de ¹⁴C; por el contrario, el hecho de vivir en el campo mantiene constantes las concentraciones isotópicas del carbono. Aunque existan zonas internacionales de distribución de ¹⁴C, es necesario tener datos de subregiones para obtener resultados más precisos. En México existen diversos ambientes, que son de interés forense. Tanto en zonas rurales como en ciudades se han cometido delitos en los que es necesario determinar la edad de las personas. De este modo se hace necesario estudiar la distribución de ¹⁴C en el país.

Cada vez que se encuentre una muestra quemada o calcinada es necesario obtener información sobre las condiciones en que se llevó a cabo el incendio con el fin de encontrar y tener identificadas las fuentes de variación. Los resultados de la determinación de edad por medio del ¹⁴C pueden verse afectadas por efecto de combustibles fósiles; ya que estos envejecerían las muestras por el contacto e

intercambio iónico entre el esmalte dental y el medio. Si los combustibles son de naturaleza orgánica como madera, la edad se afecta haciendo que sea menor a la real. La atmósfera en la cual se desarrolló el incendio es otro factor que modifica la concentración de ¹⁴C y, por tanto, la edad de la muestra. En este experimento se utilizó una atmósfera inerte la cual previene el intercambio de iones entre el esmalte y los gases presentes. En una atmósfera rica en CO₂ el esmalte es susceptible a adsorber carbono y por tanto la edad de la muestra se modificaría.

La temperatura, como se demostró en este experimento, afecta la concentración de ¹⁴C. Si esta aumenta, el carbono, en forma de carbonatos, tanto adsorbidos como los que son parte de la estructura cristalina, se pierden dando lugar a resultados más jóvenes, en algunos casos se presentan resultados antiguos. La temperatura teórica máxima a la cual son confiables los resultados es hasta los 750°C, momento en el cual los carbonatos presentes comienzan a perderse. En este estudio se comprobó que a partir de los 600°C los resultados son menos exactos. Debe tomarse en cuenta que, en este experimento, las piezas dentales fueron expuestas directamente al calor, es decir, no fueron protegidas por tejidos como la lengua, encías o mejillas. Los tejidos antes mencionados ofrecen protección ante altas temperaturas a las que pueden estar expuestos los dientes, de ahí que las piezas dentales más protegidas son las anteriores, donde la lengua y la encía ofrece humedad para evitar un aumento de temperatura repentino.

Se sabe por medios de comunicación que los delincuentes tratan de borrar toda evidencia que lleve a reconocer a las personas desparecidas. Es entonces cuando los pocos restos que se recuperan, desde trozos de prendas, huesos, dientes e incluso material que rodea la zona, son de gran importancia para reconstruir la escena del delito. Un aspecto a considerar es la temperatura que pueden alcanzar las diversas escenas que involucren fuego, así como la duración de las mismas. Para que un cuerpo desaparezca en un incendio al aire libre, es necesaria la cantidad equivalente a 700 Kg de madera [80]. Con esta cantidad de combustible es posible alcanzar temperaturas de hasta 800°C; sin embargo, el tiempo que se requiere para calcinar un cuerpo, sin desintegrar los huesos, es de seis horas [80]. Puesto que este tipo de incendios es controlado, las piezas dentales, aunque llegan a resistir las altas temperaturas, son destruidas por otros medios y desafortunadamente la evidencia desparece dejando de lado la posibilidad de usar

68

la técnica de espectrometría de masas con aceleradores como apoyo a las ciencias forenses.

Por otra parte, cuando el incendio es provocado de manera accidental el tiempo que transcurre desde que se genera hasta que es sofocado puede ser menor, del mismo modo las temperaturas que pueden alcanzarse no superan los 700°C. Considerando que los tejidos que rodean a los huesos y dientes funcionan como aislantes, la temperatura alcanzada y el tiempo que dura un incendio accidental no es suficiente para modificar la estructura de la hidroxiapatita y, por tanto, es posible determinar la edad de una persona por medio del contenido de ¹⁴C siempre y cuando sea posible recuperar las piezas dentales indicadas.

El análisis de cada elemento encontrado en un contexto forense es de suma importancia y cabe resaltar que cada análisis se hace en función del átomo de carbono. Ya sea por medio de concatenación, de manera combinada con otros átomos o en su forma elemental, el carbono ofrece información muy valiosa que puede conducir al conocimiento de la verdad.

Los dientes, por su comportamiento fisicoquímico, pueden resistir altas temperaturas, así como ciertos tratamientos químicos extremos. Es entonces cuando la espectrometría de masas con aceleradores y el tratamiento de recuperación y preservación del esmalte, juega un papel crucial como auxiliar en la ciencia forense.

6. Conclusiones

La técnica de Espectrometría de Masas con Aceleradores permite determinar con muy buena aproximación la fecha de nacimiento de las personas. Para tener más exactitud en las mediciones es necesario considerar factores como el efecto Suess y el fraccionamiento isotópico. Deben tenerse más datos sobre la cronología de formación y erupción dentaria en población mexicana.

Se desarrolló un procedimiento que permite la limpieza dental para su análisis por EMA; con ella es posible remover el material orgánico que interfiere en la determinación de la cantidad de ¹⁴C en el esmalte.

El fuego deteriora las piezas dentales y dificulta determinar con exactitud la cantidad de ¹⁴C. En este experimento las muestras que presentaron medidas más cercanas a las reales son las que se sometieron a 500°C. A partir de los 600°C las medidas se volvieron más lejanas a los resultados reales. Esto concuerda con la pérdida de agua, la remoción de carbonatos adsorbidos y que son parte de la bioapatita y, en un primer momento el daño, así como la posterior recristalización de la hidroxiapatita en el esmalte dental.

Las piezas dentales que ofrecen mejores resultados son los primeros molares y primeros premolares. Dientes con el tamaño adecuado para el análisis y con un periodo de formación de la corona corto. Además, se encuentran protegidos por tejidos como la lengua y las mejillas, los cuales evitan que el ¹⁴C se desprenda y se modifique la edad.

La incertidumbre de las mediciones disminuye cuando las muestras se acercan al periodo en que se formó el pico de la bomba; es decir, durante el periodo de 1950 a 1990.

7. Apéndice

Análisis Raman de muestras de esmalte dental tratado a diferentes temperaturas

El espectrómetro Raman utilizado fue un Raman dispersivo Senterra de Bruker, equipado con un láser de 785 nm y un microscopio Olympus. Todas las muestras fueron observadas bajo las mismas condiciones de operación del espectrómetro. Se utilizó una apertura de 50 μ con el objeto de disminuir la fluorescencia, la cual estuvo presente para todas las muestras excepto para la muestra de control y un objetivo de 20 X. Los espectros se adquirieron en un intervalo espectral de 70 a 3500 cm⁻¹, con una resolución de 3 a 5 cm⁻¹. La potencia del láser fue de 100 mW, con un tiempo de integración de 1 seg y 15 repeticiones, para cada espectro.

Las muestras analizadas fueron las siguientes:

Muestra	Temperatura
	de tratamiento (°C)
834	control
831	500
839	600
835	700

Otras muestras no se analizaron debido a que las superficies no eran planas por lo que el enfoque al microscopio era difícil.

Conforme la temperatura de tratamiento de las muestras aumentó, se apreció al microscopio que aumentaba el daño al esmalte, como se observa de las fotografías.





Fotografías tomadas con objetivo 20 X de las muestras tratadas térmicamente: (a) muestra control; (b) 500 °C; (c) 600 °C; (d) 700 °C.

Espectros Raman

Para cada muestra se adquirieron nueve espectros y utilizando el software OPUS del equipo se obtuvieron para cada espectro la posición y ancho de banda para la banda más intensa de la hidroxiapatita, que es la banda v_1 del fosfato, aproximadamente en 960 cm⁻¹.

Los resultados obtenidos se muestras en las siguientes figuras.



Fig. A1. Espectros Raman de muestras sometidas a diferentes tratamientos térmicos: (a) muestra control; (b) 500 °C; (c) 600 °C y (d) 700 °C.



Fig. A2. Cambio del ancho de la banda v_1 del fosfato, para muestras seleccionadas sometidas a los diferentes tratamientos térmicos.

De la gráfica anterior se observan, tanto el aumento en el ancho de banda conforme aumenta la temperatura de tratamiento, como el corrimiento de la posición de la banda v₁ del fosfato hacia frecuencias más bajas.



Fig. A3. Cambio en la posición de la banda v_1 con los tratamientos térmicos.



Fig. A4. Cambio en el ancho de banda promedio con respecto a la temperatura de tratamiento.

8. Referencias

[1] V. E. Viola, "Formation of the chemical elements and the evolution of our universe", *J. Chem. Educ.*, vol. 67, núm. 9, p. 723, 1990.

[2] H. O. Pierson, "Handbook of carbon, graphite, diamond and fullerenes", *Noyes Plubications*, pp. 1–417, 1993.

[3] D. D. L. Chung, "Review: Graphite", *Journal of Materials Science*. 2002.

[4] S. lijima, "Helical microtubules of graphitic carbon", *Nature*, vol. 354, pp. 56–58, 1991.

[5] R. Bevavente, "La ciencia de convertir el grafito en diamante", *El confidencial*, 2014. [En línea]. Disponible en: https://www.elconfidencial.com/tecnologia/2014-04-15/la-ciencia-de-convertir-el-grafito-en-un-diamante_116739/. [Consultado: 10-feb-2017].

[6] J. G. Domínguez Chávez, K. Mondragón Vásquez, Ó. García Barradas, y R. Mendoza López, "Los fulerenos, una maravillosa forma del carbono", REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA. 2013. línea]. [En Disponible en: https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol26num2/articulos/fulerenos.html. [Consultado: 25-mar-2017].

[7] H. Qiu y J. Yang, *Structure and Properties of Carbon Nanotubes*, núm. 2. Elsevier Inc., 2017.

[8] E. H. L. Falcao y F. Wudl, "Carbon allotropes: Beyond graphite and diamond", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 82, núm. 6, pp. 524–531, 2007.

[9] University of New Hampshire, "An introduction to the global cycle", *GLOBE Carbon Cycle*, p. 12, 2014.

[10] I. Hajdas, "Radiocarbon dating and its applications in Quaternary studies", *Quat. Sci. J.*, vol. 57, pp. 2–24, 2008.

[11] H. Godwin, "Half-Life of Radiocarbon", *Nature*, vol. 195, p. 984, 1962.

[12] P. C. Blanco, "El petróleo. Historia y refino.", Escuela Univeristaria de Ingenieria Técnica Industrial de Zaragoza, 2010.

[13] P. G. Falkowski *et al.*, "The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system.", *Science (80-.).*, vol. 290, núm. 5490, pp. 291–296, 2000.

75

[14] I. Prentice, G. Farquhar, y M. Fasham, "The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide", *Clim. Chang. 2001 Sci. Basis*, pp. 183–237, 2001.

[15] D. Nelson y M. Cox, *Principios de Bioquímica de Lehninger*, 5a ed. Barcelona: OMEGA, 2009.

[16] D. S. Goodsell, "Collagen", *RCSB Protein Data Bank*, 01-abr-2000. [En línea].Disponible en: http://pdb101.rcsb.org/motm/4.

[17] W. F. Libby, "History of Radiocarbon dating", *Radioactive dating and methods of low-level counting*. pp. 3–26, 1967.

[18] S. Ruben y M. D. Kamen, "Long-Lived Radioactive Carbon: C 14", *Phys. Rev.*, vol. 59, núm. 1936, pp. 349–354, 1941.

[19] S. A. Korff, "The Latitude Effect in Cosmic Radiation at High Altitudes", *Phys. Rev.*, vol. 5, pp. 14–23, 1938.

[20] G. J. Russell, "Spallation Physics - An Overview", *Int. Collab. Adv. Neutron Sources KEK. Tsukuba*, pp. 291–299, 1990.

[21] R. M. Key, "Radiocarbon", en *Encyclopedia of Ocean Sciences*, vol. 75, núm.4, Elsevier, 2001, pp. 2338–2353.

[22] R. E. Taylor, A. Long, y R. S. Kra, Eds., *Radiocarbon After Four Decades*. New York, NY: Springer New York, 1992.

[23] H. De Vries, M. Stuiver, y I. Olsson, "A PROPORTIONAL COUNTER FOR LOW LEVEL COUNTING WITH HIGH EFFICIENCY", *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. B*, vol. 5, pp. 111–114, 1959.

[24] P. Elmer, "Liquid Scintillation Counting", 2017. [En línea]. Disponible en: http://www.perkinelmer.com/es/lab-products-and-services/application-support-

knowledgebase/radiometric/liquid-scintillation-counting.html. [Consultado: 15-mar-2017].

[25] K. O. Münnich, "Heidelberg Natural Radiocarbon Measurements I", *Science* (80-.)., vol. 126, pp. 194–199, 1957.

[26] S. Bowman, *Radiocarbon Dating*. Great Britain: University of California Press, 1990.

[27] P. E. Damon y A. N. Peristykh, "Radiocarbon Calibration and Application to Geophysics, Solar Physics, and Astrophysics", *Radiocarbon*, vol. 42, núm. 1, pp. 137–150, 2000.

[28] H. E. Suess, "Radiocarbon Concentration in Modern Wood", *Science (80-.).*, vol. 122, núm. 3, pp. 415–417, 1955.

[29] H. De Vries, "Atomic Bomb Effect: Variation of Radiocarbon in Plants, Shells, and Snails in the Past 4 Years", *Science (80-.).*, vol. 128, núm. 3318, pp. 250–251, 1958.

[30] R. Nydal, "Increase in Radiocarbon from the Most Recent Series of Thermonuclear Tests", *Nature*, vol. 200, núm. 4903, pp. 212–214, 1963.

[31] I. Levin, S. Hammer, B. Kromer, y F. Meinhardt, "Radiocarbon observations in atmospheric CO2: Determining fossil fuel CO2 over Europe using Jungfraujoch observations as background", *Sci. Total Environ.*, vol. 391, núm. 2–3, pp. 211–216, 2008.

[32] Q. Hua, M. Barbetti, y A. Z. Rakowski, "Atmospheric radiocarbon for the period 1950-2010", *Radiocarbon*, vol. 55, núm. 4, pp. 2059–2072, 2013.

[33] U. Zoppi, Z. Skopec, J. Skopec, G. Jones, y D. Fink, "Forensic applications of C bomb-pulse dating", vol. 224, pp. 770–775, 2004.

[34] J. R. Ehleringer, J. F. Casale, J. E. Barnette, X. Xu, M. J. Lott, y J. Hurley, "14C analyses quantify time lag between coca leaf harvest and street-level seizure of cocaine", *Forensic Sci. Int.*, 2012.

[35] W. F. Libby, E. C. Anderson, y J. R. Arnold, "Age Determination by Radiocarbon Content: World-Wide Assay of Natural Radiocarbon.", *Science*, vol. 109, núm. 2827, pp. 227–8, 1949.

[36] K. E. Stenström, G. Skog, E. Georgiadou, J. Genberg, y A. Johansson, "A guide to radiocarbon units and calculations", vol. 6, núm. October, pp. 0–17, 2011.

[37] E. Reyes, "Geoquímica de Isótopos Estables: Fundamentos, Técnicas y Aplicaciones", *Geoquímica Isotópica Apl. al Medioambiente, Semin. la Soc. Española Mineral.*, vol. 1, pp. 1–19, 2004.

[38] B. J. MacFadden y P. Higgins, "Ancient ecology of 15-million-year-old browsing mammals within C3 plant communities from Panama", *Oecologia*, vol. 140, núm. 1, pp. 169–182, 2004.

[39] L. Taiz y E. Zeiger, *Plant Physiology*, 3rd ed. 2010.

[40] M. Stuiver y H. A. Polach, "Discussion: reporting of 14 C data", *Radiocarbon*, vol. 19, núm. 3, pp. 355–363, 1977.

77

[41] M. Stuiver y S. W. Robinson, "University of Washington Geosecs North Atlantic carbon-14 results", *Earth Planet. Sci. Lett.*, vol. 23, núm. 1, pp. 87–90, 1974.

[42] W. Mook y J. Van Der Plicht, "Reporting 14C activities and concentrations.", *Radiocarbon*, vol. 41, núm. 3, pp. 227–239, 1999.

[43] D. J. Donahue, T. W. Linick1, y A. J. T. Dull, "ISOTOPE-RATIO AND BACKGROUND CORRECTIONS FOR ACCELERATOR MASS SPECTROMETRY RADIOCARBON MEASUREMENTS", *Radiocarbon*, vol. 32, núm. 2, pp. 135–142, 1990.

[44] P. J. Reimer, T. A. Brown, y R. W. Reimer, "Discussion: reporting and calibration of post-bomb 14C data.", *Radiocarbon*, vol. 46, núm. 1, pp. 1299–1304, 2004.

[45] Q. Hua, M. Barbetti, y a Z. Rakowski, "Atmospheric radiocarbon for the period 1950-2010", *Radiocarbon*, vol. 55, núm. 4, pp. 2059–2072, 2013.

[46] T. Martín y A. Serano, "Magnetismo", Universidad Politécnica de Madrid. [En línea]. Disponible en: http://acer.forestales.upm.es/basicas/udfisica/asignaturas/fisica/magnet/espectromet ro.html. [Consultado: 20-mar-2017].

[47] R. A. Muller, "Radioisotope dating with accelerators", *Phys. Today*, vol. 32, núm. 2, pp. 23–30, 1979.

[48] D. E. Nelson, Korteling R. G., y W. R. Stoot, "Carbon-14: Direct Detection at Natural Concentrations", *Science (80-.).*, vol. 198, núm. 4316, pp. 507–508, 1977.

[49] C. L. Bennett, R. P. Beukens, y M. R. Clover, "Radiocarbon Dating Using Electrostatic Accelerators: Negative Ions Provide the Key", *Science (80-.).*, vol. 198, núm. 4316, pp. 508–510, 1977.

[50] L. K. Fifield, "Accelerator mass spectrometry and its applications", *Reports Prog. Phys.*, vol. 62, núm. 99, pp. 1223–1274, 1999.

[51] K. H. Purser *et al.*, "An attempt to detect stable N- ions from a sputter ion source and some implications of the results for the design of tandems for ultrasensitive carbon analysis", *Rev. Phys. Appliquée*, vol. 12, núm. 10, pp. 1487–1492, 1977.

[52] R. Hellborg y G. Skog, "ACCELERATOR MASS SPECTROMETRY", *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 27, pp. 398–427, 2008.

[53] M. E. Gómez de Ferrariz y A. Campos Muñoz, *Histología y embriología bucodental*, Segunda Ed. Editorial Médica Panamericana, 2004.

[54] N. Ash, *Wheeler's Dental Anatomy, Physiology, and Occlusion 9th Edition*, vol. 53, núm. 9. 2013.

[55] Z. M. de O. Eduardo, "Análsis de la composición y estructura del esmalte y la unión amelodentaria en dientes humanos", Facultad de Odontología, UNAM, 1999.

[56] R. Williams y J. Elliot, *Bioquímica dental básica y aplicada*, Segunda ed. Mexico D.F.: El Manual Moderno, 1990.

[57] I. A. Weatherell, C. Robinson, y C. R. Hiller, "Distribution of Carbonate in Thin Sections of Dental Enamel", *Caries Res.*, vol. 2, núm. 1, pp. 1–9, 1968.

[58] C. Snoeck y M. Pellegrini, "Comparing bioapatite carbonate pre-treatments for isotopic measurements: Part 1-Impact on structure and chemical composition", *Chemical Geology*. 2015.

[59] B. Wopenka y J. D. Pasteris, "A mineralogical perspective on the apatite in bone", en *Materials Science and Engineering C*, 2005.

[60] R. Zapanta LeGeros, "Apatites in biological systems", *Prog. Cryst. Growth Charact.*, vol. 4, núm. 1–2, pp. 1–45, 1981.

[61] Facultad de Medicina, "Licenciatura en Ciencia Forense", *UNAM*, 2014. [En línea]. Disponible en: http://www.cienciaforense.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2015/02/presentaEjecutiva.pdf. [Consultado: 07-feb-2017].

[62] F. Marzaioli, V. Fiumano, M. Capano, I. Passariello, N. De Cesare, y F. Terrasi, "Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B C at CIRCE", *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. B*, vol. 269, núm. 24, pp. 3171–3175, 2011.

[63] T. Nakamura *et al.*, "Application of AMS 14C measurements to criminal investigations", en *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2007.

[64] S. Ritz-Timme *et al.*, "Age estimation: The state of the art in relation to the specific demands of forensic practise", *International Journal of Legal Medicine*, vol. 113, núm. 3. pp. 129–136, 2000.

[65] P. Masters Helfman y J. L. Badat, "Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans", *Biochemistry*, vol. 72, núm. 8, pp. 2891–2894, 1975.

[66] E. Solis-Meza, "Fechamiento de piezas dentales modernas con Carbono-14 por espectrometría de masas con aceleradores", Facultad de Ciencias, UNAM, 2016.

[67] K. L. Spalding, B. A. Buchholz, L. E. Bergman, H. Druid, y J. Frisen, "Forensic Medicine: Age Written in Teeth by Nuclear Bomb Tests", *Nature*, vol. 473, núm. 7057, 2005.

[68] K. Kunita, T. Nakamura, y K. Kato, "Accurate Age Estimation Using 14C Content in Japanese Human Teeth", *Radiocarbon*, núm. November 2015, pp. 1–18, 2017.

[69] C. Adams, R. Carabott, y S. Evans, *Forensic Odontology: An Essential Guide*. John Wiley & Sons, 2013.

[70] INEGI, "Mortalidad", *Registros administrativos*, 2017. [En línea]. Disponible en: http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/registros/vitales/mortalidad/. [Consultado: 01-may-2017].

[71] S. T. D. Ellingham, T. J. U. Thompson, M. Islam, y G. Taylor, "Estimating temperature exposure of burnt bone - A methodological review", *Science and Justice*, vol. 55, núm. 3. Forensic Science Society, pp. 181–188, 2015.

[72] J. López-Palafox, "Muertes por Carbonización. Metodología en la Identificación. Aplicación de la Odontología Forense", en *Guía Practica de odontología forense*, 2002, pp. 52–60.

[73] K. Alkass *et al.*, "Analysis of Radiocarbon, Stable Isotopes and DNA in Teeth to Facilitate Identification of Unknown Decedents", *PLoS One*, vol. 8, núm. 7, pp. 1– 12, 2013.

[74] L. Wacker, M. Němec, y J. Bourquin, "A revolutionary graphitisation system: Fully automated, compact and simple", *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 268, núm. 7–8, pp. 931–934, 2010.

[75] J. S. Vogel, J. R. Southon, D. E. Nelson, y T. A. Brown, "PERFO ~ N ~ OF CATAL ~~ ALLY MASS SPECHtOMETRY CONDENSED CARBON FOR USE IN ACCELERATOR", pp. 289–293, 1984.

[76] L. Wacker, R. H. Fülöp, I. Hajdas, M. Molnár, y J. Rethemeyer, "A novel approach to process carbonate samples for radiocarbon measurements with helium carrier gas", *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 294, pp. 214–217, 2013.

[77] J. Reyes-Gasga *et al.*, "Structural and thermal behaviour of human tooth and three synthetic hydroxyapatites from 20 to 600 °C", *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 41, núm. 22, p. 225407, 2008.

[78] L. E. Munro, F. J. Longstaffe, y C. D. White, "Effects of heating on the carbon and oxygen-isotope compositions of structural carbonate in bioapatite from modern deer bone", *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, vol. 266, núm. 3–4, pp. 142–150, 2008.

[79] M. Sandholzer, "Chapter 21 – Influence of Heating Regimes on Dimensional and Colorimetric Changes of Teeth", en *The Analysis of Burned Human Remains*, Elsevier Ltd, 2015, pp. 365–379.

[80] A. V. Villa, Á. M. Buitrago, C. M. Beristain, C. Paz, y F. C. Vial, "Informe Ayotzinapa. Investigación y primeras conclusiones de las desapariciones y homicidios de los normalistas de Ayotzinapa", *Grup. Interdiscip. Expert. Indep.*, 2015.