

**Olivier SIRE, Experto en el Tribunal de Apelación de
Rennes El Tribunal de Apelación de Rennes
En Análisis Psicoquímico, Biológico y Alimentario-Industrial**

Traduction: Antoine Bruno

INFORME PERICIAL

Solicitante : Sr. Thierry JAMIN

Recordatorio de Misión.....	2
Metodología de peritaje.....	2
Análisis espectroscópicos por infrarrojos.....	4
Adquisiciones por infrarrojos.....	6
Análisis espectral.....	6
Análisis comparativos.....	12
Conclusiones generales.....	17

Recordación de la Misión

Como parte de "The Alien Project", cinco muestras de diferentes partes del cuerpo de momias encontradas en el sitio de Nazca (Perú), me fueron enviadas para examinar su composición molecular mediante espectroscopia infrarroja media. Esta técnica identifica la composición (bio)química de cualquier muestra compuesta de materia orgánica. Por lo tanto, esta experiencia tiene como objetivo analizar estos fragmentos momificados.

Los análisis se llevaron a cabo en el Instituto de Investigación Dupuy de Lôme (UMR CNRS 6027) en Vannes, Francia.

Las muestras se enumeraron de la siguiente manera:

- 01 - VICTORIA HUESO (cadera)
- 02 - MANO TENDÓN (tridáctila)
- 03 - MANO HUESO
- 04 - MARIA SACRO
- 05 - MARIA CADERA

Metodología de peritaje

Las cinco muestras se enviaron en pequeños tubos o viales de plástico. Un primer paso fue hacer fotos de gran aumento de ellos. Las fotos de abajo fueron obtenidas con una cámara Nikon D610 y un objetivo MACRO NIKKOR105 1:2.8. Para indicar la escala, se fotografió sistemáticamente una pila de botón de 8 mm de diámetro con los objetos. Las imágenes de alta resolución están disponibles en un archivo comprimido separado de este informe.



Fig.1 VICTORIA HUESO (dos lados)



Fig.2 MANO TENDÓN (dos lados)



Fig. 3 MANO HUESO TRIDÁCTILA (dos lados)

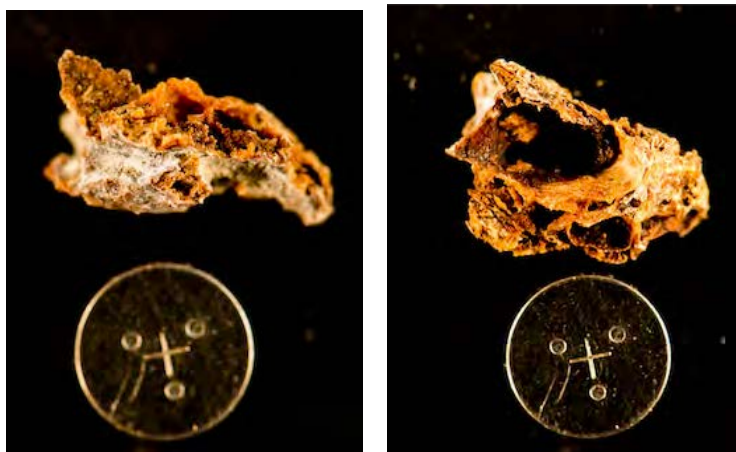


Fig. 4 MARIA SACRO (dos lados)



Fig. 5 MARIA CADERA (dos lados)

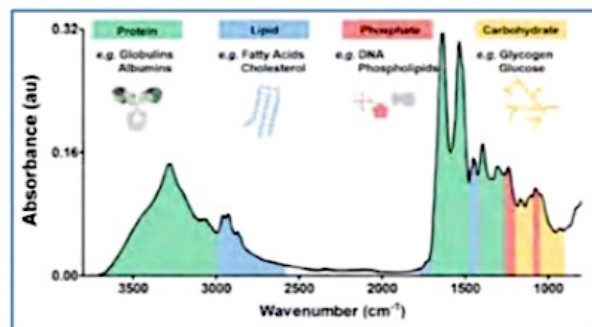
Análisis espectroscópicos infrarrojos.

Las muestras se analizaron luego en espectroscopía de infrarrojo medio (MIR) utilizando un microscopio infrarrojo Lumos (Bruker) en modo micro ATR.



FIG. 6 Microspectrofotómetro LUMOS

Típicamente, esta espectroscopia de absorción permite identificar los grupos químicos presentes en la muestra de interés a través de sus modos vibracionales. Los grupos químicos (O-H, C-C, N-H, N-H, N-H, C=O, etc....) tienen diferentes bandas de absorción en su posición en el espectro en función de la masa de los átomos que están conectados por un enlace químico



covalente y del tipo de enlace (simple o doble). La figura anterior muestra los principales dominios espectrales que reflejan las contribuciones respectivas de proteínas, lípidos (grasas), azúcares o ácidos nucleicos (ADN, ARN).

Para fines de comparación, se analizaron diferentes muestras de "referencia". Estas incluyen muestras de músculo, piel y hueso de pollo colocadas en un desecador durante dos meses y una muda de víbora (*Daboia palestinae*). Las imágenes correspondientes se muestran a continuación.



Fig. 7 Muda de víbora (*D. palestinae*) Fig. 8 Músculo de pollo deshidratado



Fig. 9 Huesos de pollo (dos lados)



Fig. 10 Piel de pollo deshidratada (dos lados)

Adquisiciones de infrarrojos

Las distintas muestras se analizaron mediante microspectroscopia MIR en modo ATR de reflexión simple utilizando un cristal de germanio. Las muestras entran en contacto con el cristal; el área de muestreo es de unos $2.000\text{ }\mu\text{m}^2$ sobre un espesor de $2\text{-}3\text{ }\mu\text{m}$; por lo tanto, se trata esencialmente de un análisis de superficie.

Para cada análisis, se promedian 128 espectros con una resolución espectral de 4 cm^{-1} .

Pre-procesamiento de espectros. Para optimizar la resolución espectral, se calculan los segundos derivados de los espectros y se realiza la normalización vectorial, que permite compensar las variaciones de absorbancia debidas simplemente a la "cantidad" de material visto por el cristal. Estos segundos derivados se utilizan para análisis estadísticos multivariados.

Durante las adquisiciones, se observaron pequeños puntos de ebullición en algunas muestras que caracterizan la evaporación del agua. Esto se debe a que la luz del microscopio (que se enciende antes de la adquisición del MIR) se concentra en un área muy pequeña, lo que provoca un calentamiento local. Podemos deducir que hay pequeñas bolsas de agua en las muestras que probablemente están atrapadas en un ambiente hidrofóbico, y por lo tanto impermeable, lípido. La fusión de los lípidos bajo el calor de la lámpara permitiría la evaporación del agua.

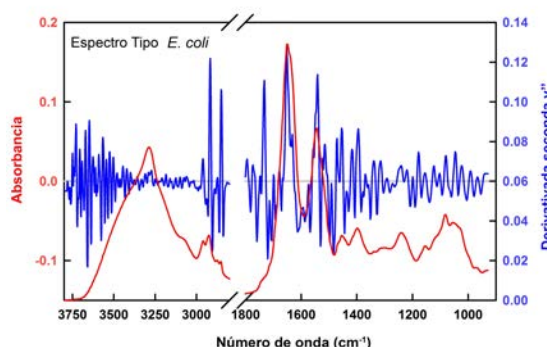
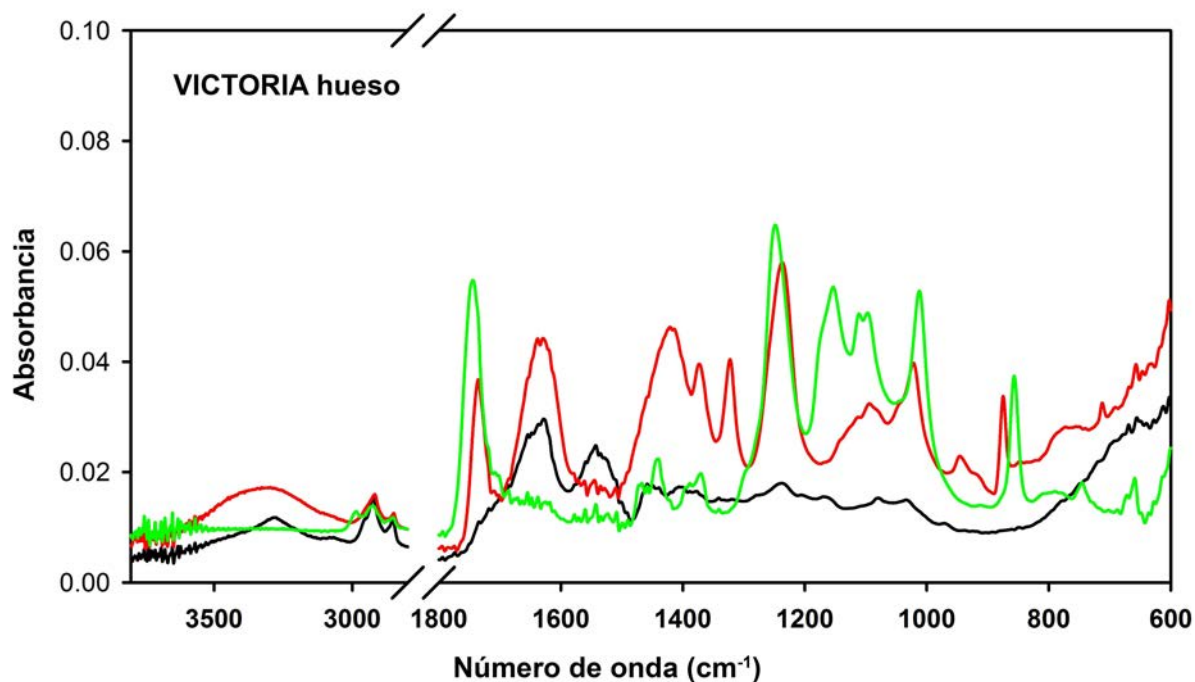


Fig. 11 *Spectrum tipo MIR (aquí de bacterias) con su segunda derivada (en azul)*

Análisis espectral.

Los espectros individuales se analizan en primer lugar para identificar sus componentes bioquímicos (proteínas, grasas, azúcares,...). Para tener en cuenta las heterogeneidades espaciales (en la escala de mm), se realizaron varias adquisiciones (de 3 a 5) en cada muestra. Se presentan los espectros más representativos. Para todas las muestras, se analizaron ambos lados.

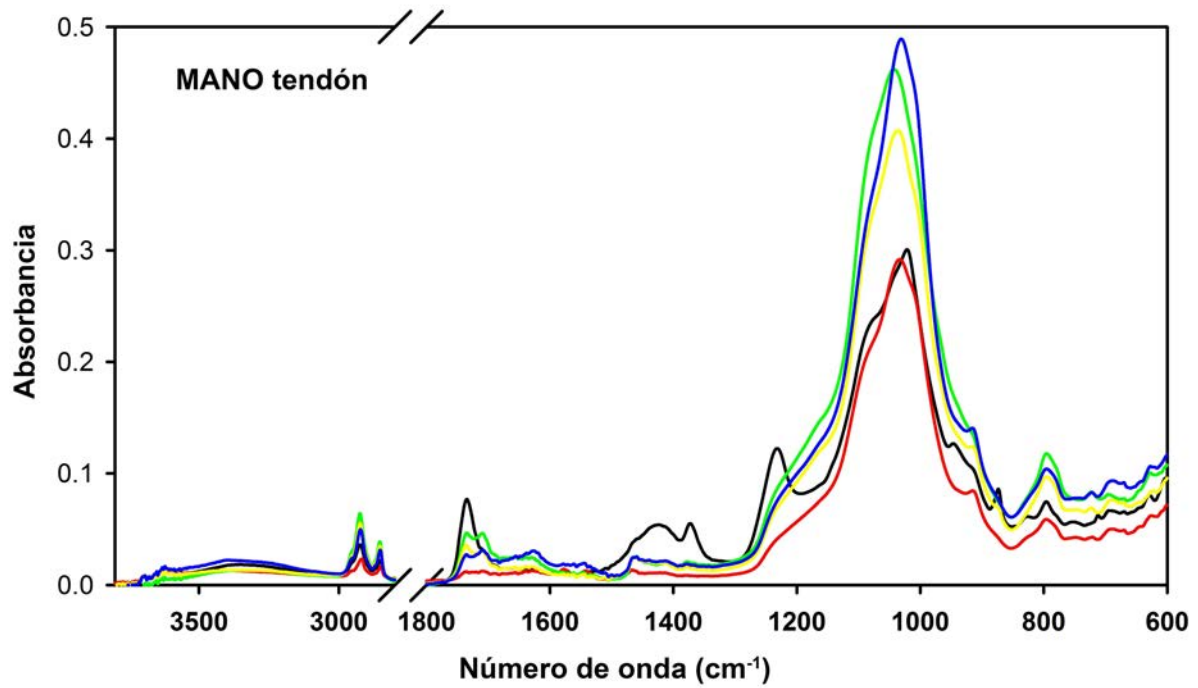
Fig. 12 VICTORIA Hueso



Esta muestra tiene una cara muy irregular (Fig.1 izquierda, espectros negros y rojos) y una cara claramente alveolada (Fig.1 derecha, espectro verde).

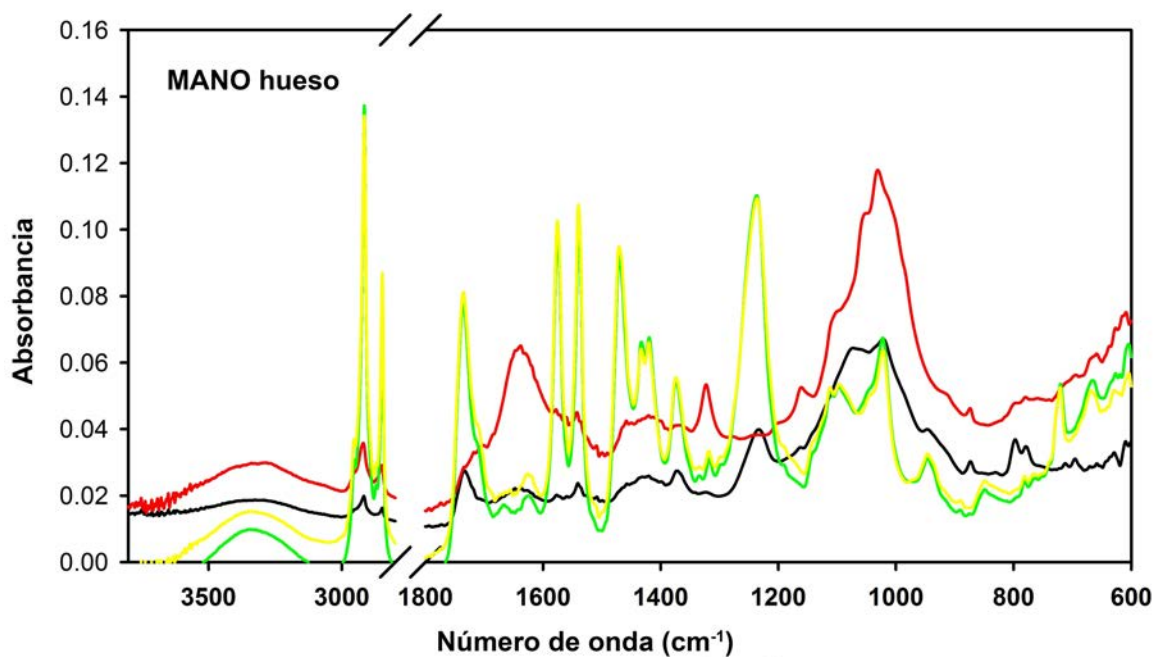
La cara irregular es heterogénea con la presencia de proteínas (amidas I y II) a 1540 y 1650 cm⁻¹, tejido mineralizado (banda de carbonato CaCO₃ a 860-870 cm⁻¹) y lípidos esterificados (1740, 1420, 1320 y masivo 2800-3000 cm⁻¹). La cara alveolada está dominada por lípidos con una banda de éster muy importante y una banda intensa de 1240. La banda 1010 debe reflejar el grupo fosfato que es característico del tejido óseo. Este último debe estar vinculado a la estructura alveolar claramente visible en la figura 1 (derecha).

Fig. 13 Mano Tendón



Los espectros "mano tendón" (Fig. 2) recogidos en cada lado (azul-verde-amarillo vs. negro-rojo) son cualitativamente cercanos si no una contribución más fuerte de la matriz fosfocálcica. (sólido a 1030 cm^{-1} y banda a 800 cm^{-1}) Los lípidos son detectables a 1740 y $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ La banda de 1230 cm^{-1} no puede asignarse de forma exclusiva. La ausencia de firma de las proteínas tendinosas características (colágeno y elastina) sugiere que estos componentes han sido destruidos o que la muestra no corresponde específicamente a este tejido sino al tejido óseo.

Fig. 14 Mano Hueso tridáctila



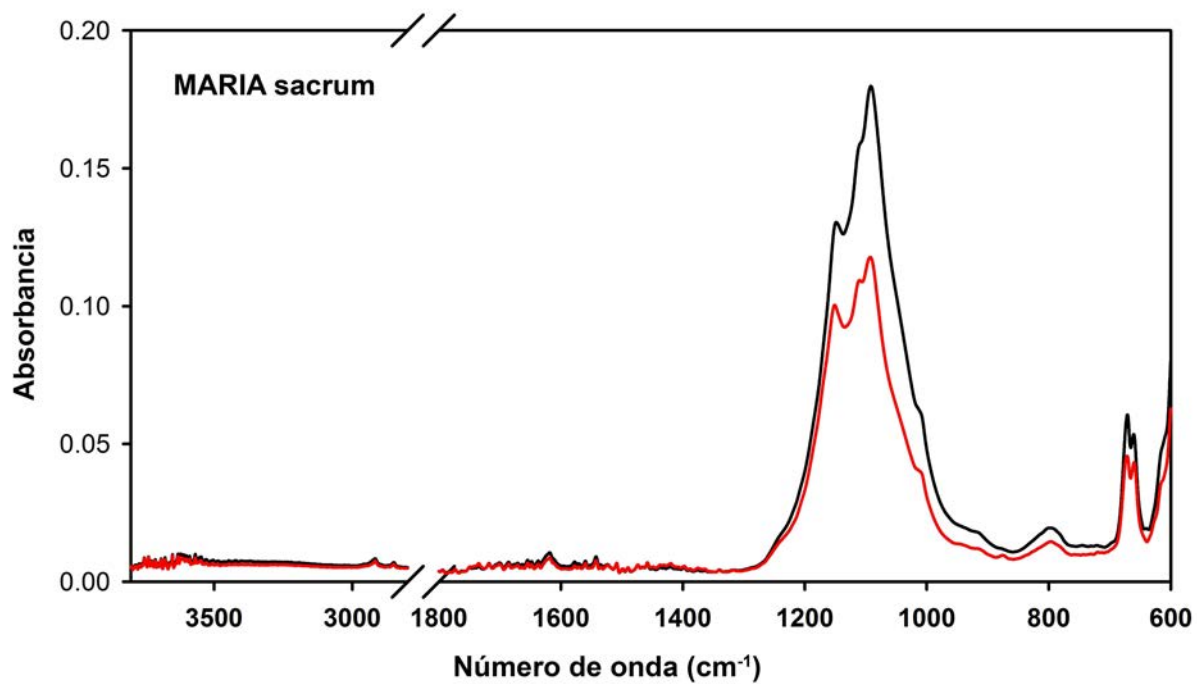
Esta muestra (Fig. 3) tiene una apariencia relativamente unida y lisa en uno de estos lados para dos fragmentos, mientras que el lado opuesto tiene una apariencia fibrosa. Consideraremos que el lado liso corresponde al lado externo del hueso, el aspecto fibroso al lado interno.

Los espectros negro y rojo corresponden al lado exterior. Estos espectros están dominados por una banda ancha e intensa (1030 cm^{-1}) que representa la vibración de los grupos de fosfato (PO_4^{3-}) característicos de la matriz mineral fosfocálcica del hueso. El hombro y el pico pequeño alrededor de 880 cm^{-1} reflejan los carbonatos. La banda de 1640 cm^{-1} es representativa del colágeno, que es la proteína más abundante en el hueso. La banda de 1320 cm^{-1} (visible en el espectro rojo) y las bandas entre 2800 y 3000 cm^{-1} reflejan los lípidos (grasas).

Los espectros adquiridos en la superficie interna del hueso están dominados en gran medida por los lípidos, que son los principales componentes de la médula ósea. La presencia de triglicéridos en altas concentraciones se manifiesta por bandas intensas entre 2800 y 3000 cm^{-1} (grupos de ácidos grasos methylene CH_2 y methyl CH_3) y 1740 cm^{-1} (C=O ester glycerol - aglutinante de triglicéridos de ácidos grasos). También hay una banda intensa a 1240 cm^{-1} que indica la vibración asimétrica de CH_2 en los fosfolípidos.

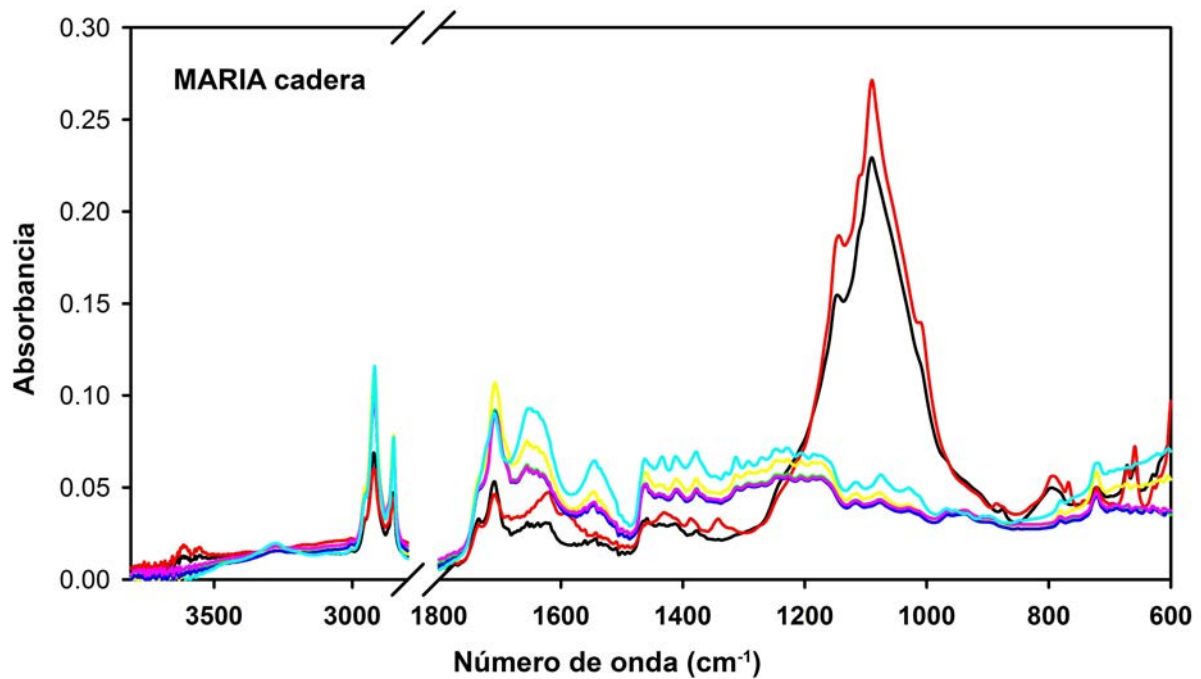
En contraste con la superficie exterior, las proteínas están prácticamente ausentes, mientras que la banda fosfocálcica (1030 cm^{-1}) es la mitad de intensa.

Fig. 15 MARIA Sacro



El espectro MIR de esta muestra (Fig. 4) está dominado por el masivo a 1030 cm⁻¹ que traduce el tejido óseo. No se detectan rastros de lípidos o proteínas. Vale la pena mencionar un doblete a 660-670 cm⁻¹ que generalmente se atribuye al grupo de azufre S = O. La presencia de azufre no se registra en la parte mineral del hueso. Por lo tanto, esta atribución puede estar sujeta a precaución.

Fig. 16 MARIA Cadera



Esta muestra tiene dos lados de diferentes aspectos. El lado mostrado en la figura 5 (derecha) se caracteriza principalmente por una banda fosfocálcica a 1030 cm⁻¹ (espectros negro y rojo) con una contribución visible de lípidos entre 2800 y 3000 cm⁻¹. El otro lado (espectros amarillo, cian, magenta y azul) es de naturaleza esencialmente lipídica (2800-3000 y 1710 cm⁻¹) con una presencia de proteínas visibles por la amida I (1640 cm⁻¹) y II (1540 cm⁻¹) características de estas macromoléculas.

Así, encontramos las características del tejido óseo con un lado esencialmente mineral y el otro marcado por los lípidos de la médula ósea.

Análisis comparativo

Con el fin de tener los tejidos de "referencia" lo más cerca posible de las muestras, se analizaron diferentes tejidos (pollo y muda de serpiente). Los tejidos de pollo fueron colocados previamente en una secadora al vacío durante dos meses en presencia de gel de sílice. La muda de serpiente ha sido analizada tal como está. Los diferentes espectros obtenidos se presentan a continuación.

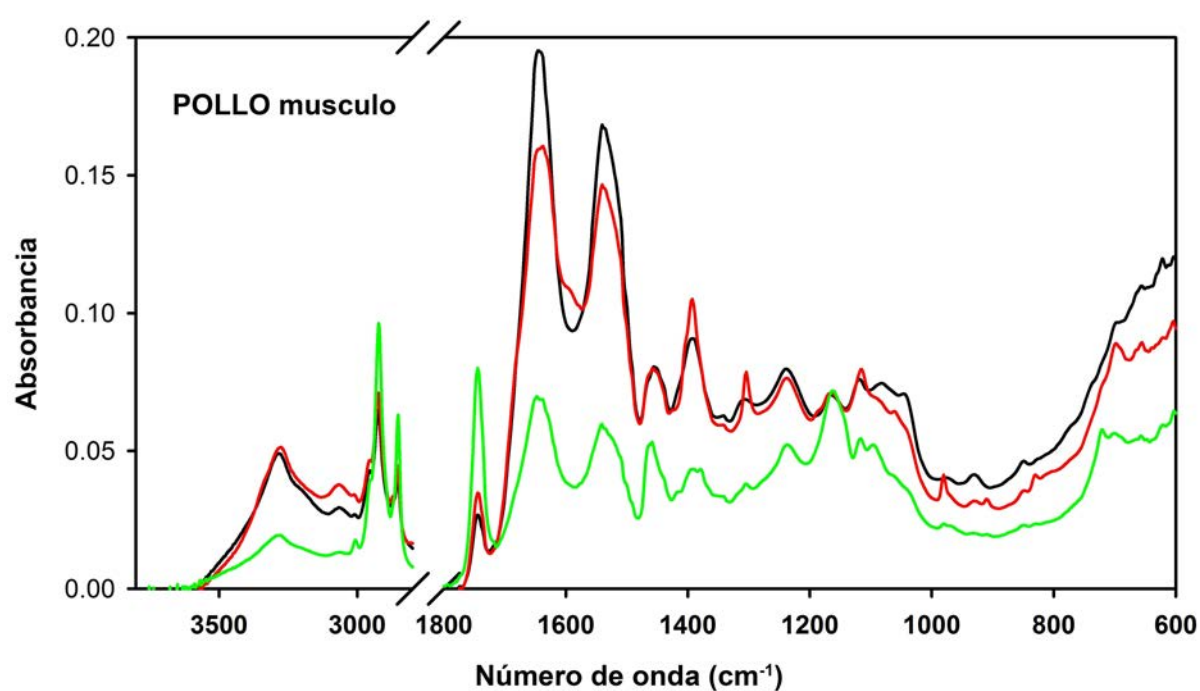


Fig. 17

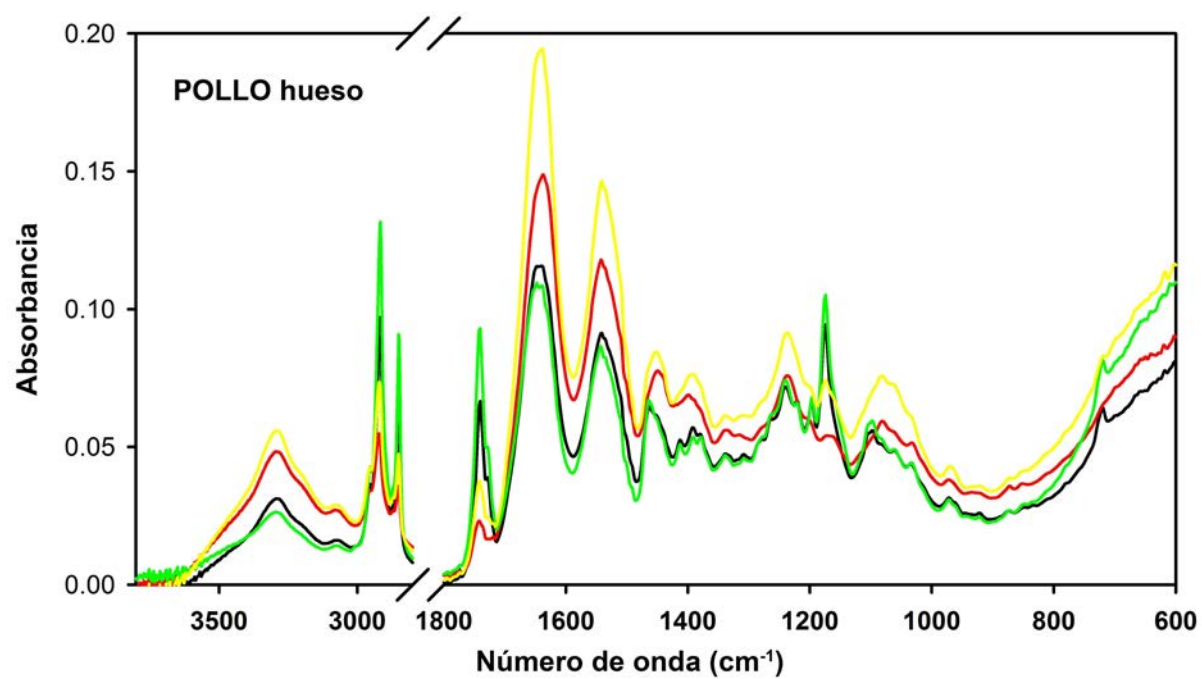


Fig. 18

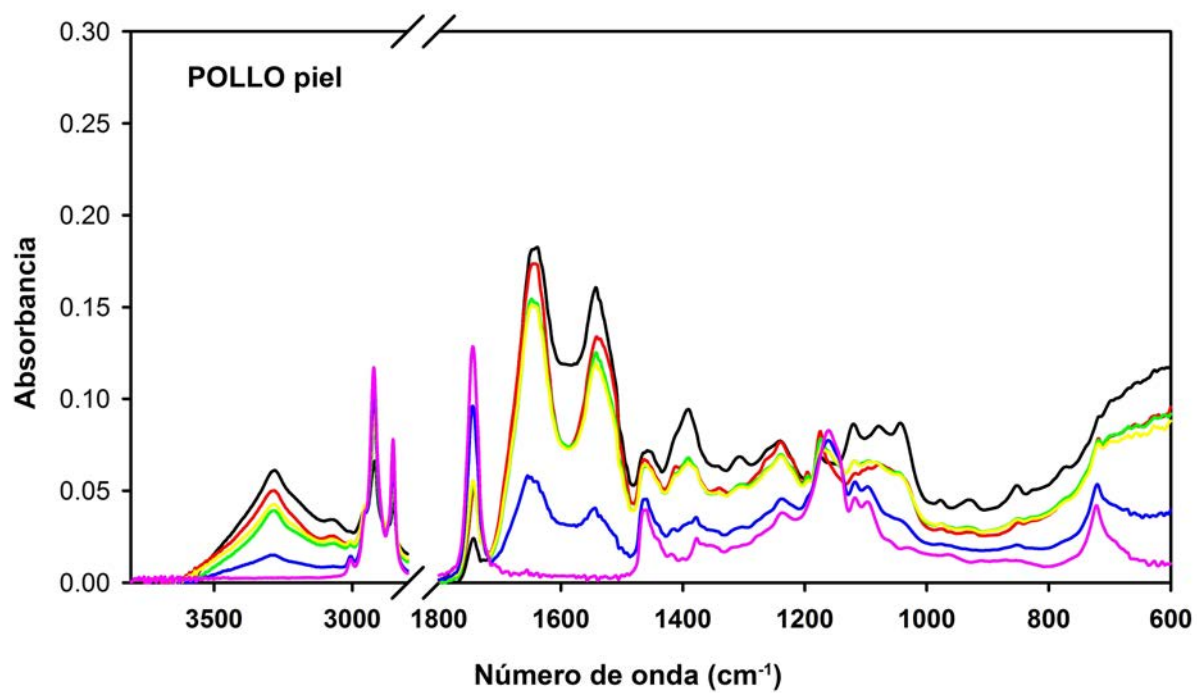
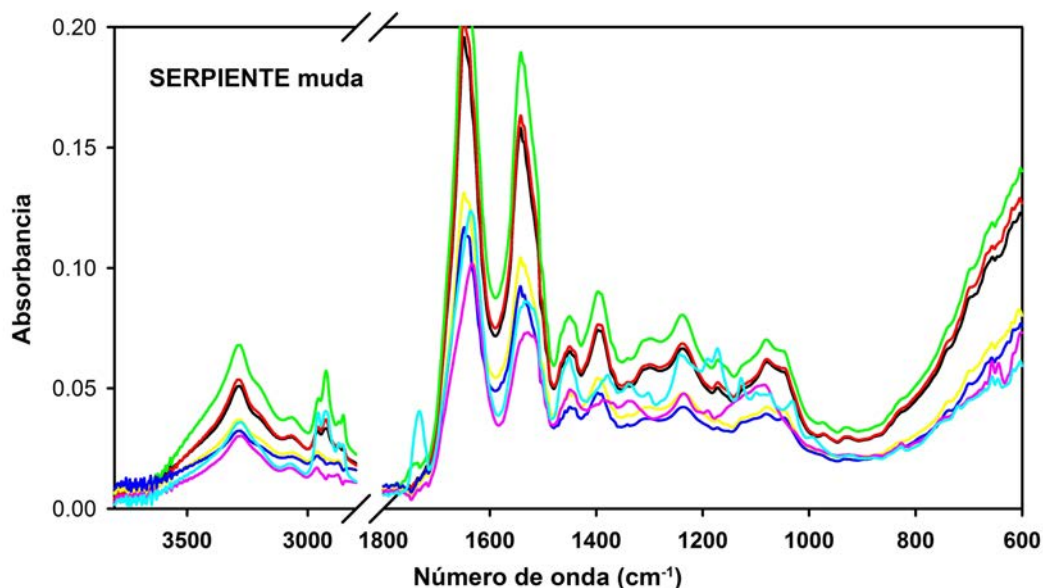


Fig. 19



El punto culminante de estas comparaciones entre las muestras de momias y las muestras de referencia es la casi ausencia (o baja concentración) de proteínas encontradas en las muestras de momias. Esto podría explicarse por una degradación química de las proteínas que resultaría en una lisis de los enlaces peptídicos que unen a los aminoácidos (una proteína es un polímero de aminoácidos). De hecho, como se mencionó anteriormente, el enlace peptídico absorbe en MIR a 1640 y 1540 cm^{-1} . Sin embargo, estas bandas de "proteínas" sólo son visibles en muestras de la cadera de María y Victoria.

También hay que tener en cuenta que los lados internos de los huesos analizados tienen una estructura alveolar.

Con el fin de resaltar las similitudes y disimilitudes entre las muestras, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Este análisis, al reducir la dimensionalidad del espectro MIR, permite calcular una "distancia euclídea" entre dos espectros representados en un espacio (aquí) bidimensional. La distancia entre dos bipuntos refleja la proximidad de dos muestras. Las siguientes figuras, llamadas mapas factoriales, muestran la distribución de los individuos (los espectros).

Códigos de muestra :

VH E/I	Victoria Hueso (cadera) lado Externo/Interno
MT	Mano Tendón
MO E / I	Mano Hueso lado Externo / Interno
MS	Maria Sacro
MH E / I	Maria Cadera lado Externo / Interno

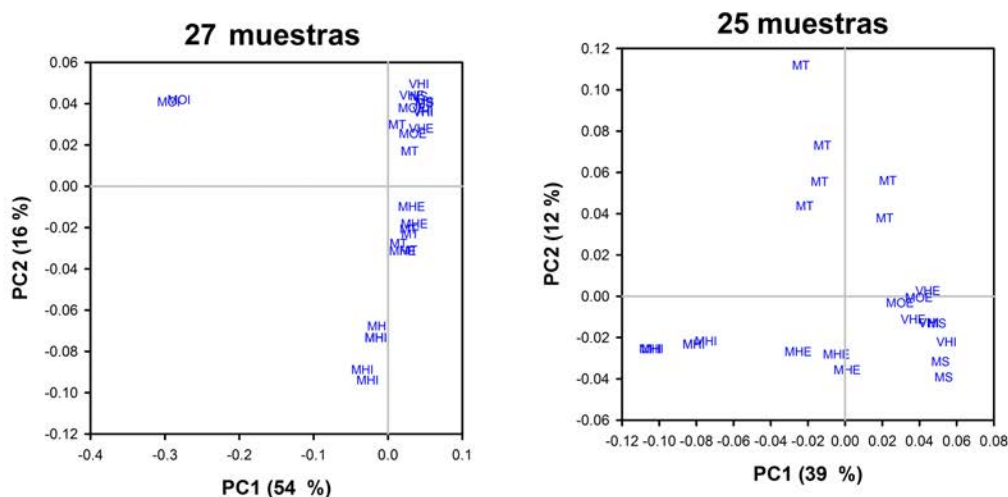


Fig. 21

La figura 21 (izquierda) muestra el mapa factorial de todas las muestras de las momias. Está muy claro que las muestras de MOI (Mano Hueso lado interno) son muy diferentes de todas las demás. Estas diferencias son evidentes al comparar sus puntuaciones (similar a las coordenadas x) negativas (aproximadamente -0.3) con las puntuaciones cercanas a cero de las otras muestras. El porcentaje que se muestra en cada eje representa el % de variabilidad representado por un componente principal dado ; 54% para PC1 y 16% para PC2 en este caso.

Por lo tanto, se realizó una segunda ACP para "dilatarse" las otras muestras; esto es lo que representa la Figura 21 derecha. Las muestras MT forman una nube distinta (o Clúster, agrupación), así como las muestras MHI y MHE. Las muestras MOE, VHE / VHI y MS están cercanas entre sí.

Una primera observación es que los hisopos de cadera de María y Victoria son distintos. Un segundo es que el lado externo de la Mano Hueso (MOE) tridactila está cerca del HEV, un poco menos que el MS.

Para situar estas muestras frente a un conjunto de "referencias", las muestras deshidratadas de pollo y muda de serpiente se proyectaron en el mapa factorial construido a partir de las únicas muestras de las momias.

Para las referencias, los códigos son:

PO E/I	Pollo hueso lado externo/interno
PP	Pollo Piel
PM	Pollo Músculo
ECA	Escama muda de víbora
TEG	Tegumento muda de víbora
SER	Lado interno de la muda de víbora

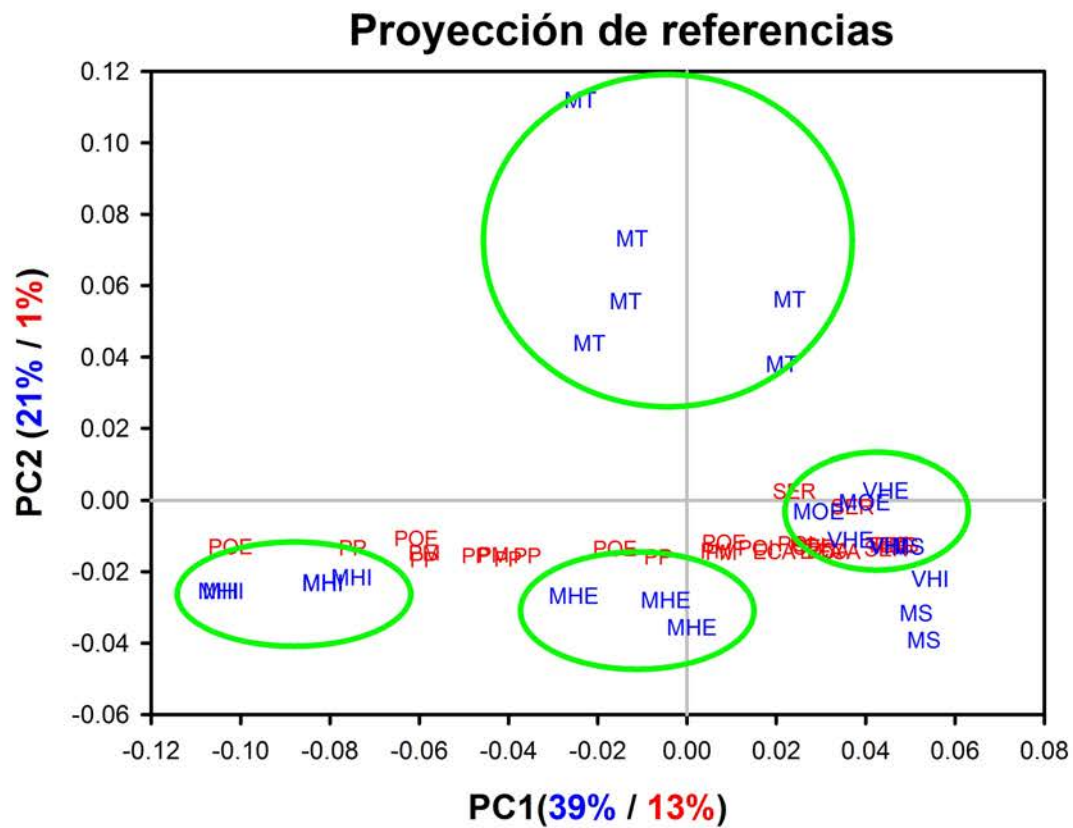


Fig. 22

Estas "referencias" se proyectan aquí en rojo. Vemos que tienen puntuaciones muy bajas a lo largo del eje PC2 (y) y que este eje tiene sólo el 1% de la variabilidad de estas referencias. Esto significa que estas muestras están muy mal descritas por el PC2 del modelo. Este no es el caso con PC1, aunque la representatividad del primer programa marco sigue siendo baja (13%).

Aunque estas "conciliaciones" son cuestionables, se observa la proximidad de la muestra de MOE (Mano Hueso Externo) a las muestras de muda de víbora.

Conclusiones generales

1. Los análisis espectrales realizados en el contexto del presente informe demuestran sin lugar a dudas que las muestras enviadas corresponden a muestras biológicas altamente deshidratadas.
2. Solo la naturaleza del tejido correspondiente a Mano Tendón parece corresponder más al tejido óseo que a un tendón, este tipo de tejido está compuesto esencialmente de proteínas, colágeno en su mayor parte. Esto puede ser similar al tejido óseo que, como se señaló, tiene niveles bajos o no detectables de proteína.
3. Los intentos de conciliar con muestras deshidratadas en el laboratorio no son concluyentes. Sería interesante poder comparar los espectros de muda de víbora con una muestra de piel de la especie reptil.
4. La muestra Mano Hueso (MOE) parece estar más cerca de Victoria (HEV) que de María ; este punto debe verificarse porque el perito no es consciente de que la muestra Mano Hueso se ha identificado como perteneciente a una especie en particular.
5. Si se necesitan tareas más precisas, deben basarse en un mayor número de muestras con un conocimiento preciso del tipo de tejido. Esto se aplica a las muestras de las momias porque , como hemos visto, la comparación con las muestras deshidratadas en el laboratorio no es concluyente.
6. El punto relativo a las proteínas , que están muy poco presentes, también debería investigarse en muestras que hayan demostrado ser músculo.

Hecho en Vannes, el 30 de julio de 2019

Olivier SIRE

Perito