



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

DATACIÓN MEDIANTE RACEMIZACIÓN DEL ÁCIDO ASPÁRTICO EN DENTINA HUMANA

*Cristopher Barriga Salazar, César Rivera Martínez, Iván Suazo Galdames **

RESUMEN:

La determinación de la edad al momento de la muerte sobre la base de la racemización del ácido aspártico (AAR) en la dentina humana se ha aplicado con éxito en odontología forense desde hace varios años. El uso de este procedimiento en la dentina proporciona una solución sencilla y rentable, cuyo método puede lograr una precisión de más menos 3 años. Actualmente esta determinación no se encuentra estandarizada, inconsistencia que se debe resolver si se pretende aplicar con éxito la técnica para la determinación de la edad en casos de interés forense. se pretende aplicar con éxito la técnica para la determinación de la edad en casos de interés forense.

PALABRAS CLAVE:

Racemización ácido aspártico, dentina, identificación, datación.

ABSTRACT:

Determining the age at death based on aspartic acid racemization (AAR) in human dentin has been applied successfully in forensic dentistry for many years. The use of this procedure in the dentine provides a simple and cost effective method which can achieve an accuracy of plus or minus 3 years. Today this determination is not standardized, inconsistencies must be resolved to successfully implement the technique for age determination in cases of forensic interest.

KEY WORDS:

Aspartic acid racemization, dentin, identification, age estimation

Filiación Autores (institución a la que se debe atribuir el trabajo): Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Talca, Chile.

Título corto: Racemización del ácido aspártico en dentina humana.

Correspondencia: Dr. César Rivera Martínez, Cirujano Dentista, Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Talca, Avenida Lircay s/n Oficina N° 104, Talca, Chile, E-mail: contacto@cesarrivera.cl

* Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Talca, Chile. Correspondencia: Dr. César Rivera Martínez, Cirujano Dentista, Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Talca, Avenida Lircay s/n Oficina N° 104, Talca, Chile, E-mail: contacto@cesarrivera.cl

Recibido para publicación: 15 de enero de 2011 Aceptado: 07 de febrero de 2011



INTRODUCCIÓN

La determinación de la edad de cuerpos humanos no identificados es importante en el marco de una investigación penal o un desastre masivo para aportar antecedentes como la edad de fallecimiento, fecha de nacimiento y año de la muerte y género, los que pueden servir de guía a los investigadores para dar con la identidad correcta entre un gran número de posibilidades. Los métodos tradicionales morfológicos utilizados por los antropólogos para determinar la edad son a menudo imprecisos, mientras que los análisis químicos han demostrado resultados reproducibles y precisos⁽¹⁾.

El envejecimiento del cuerpo humano involucra proteínas intracelulares y extracelulares que son sometidas a una serie de reacciones no enzimáticas, reacciones de degradación espontánea bajo condiciones fisiológicas.

La racemización es un proceso natural que con el paso del tiempo convierte compuestos ópticamente activos en una mezcla racémica (equilibrada) (2). Por ejemplo, en un aminoácido que tiene dos isómeros, L (levógiro) y D (dextrógiro), la racemización es la reacción química que busca tener en igual cantidad las formas L y D, y para ello ocurre la conversión de un compuesto L en D o D en L.

En los sistemas vivos, se encuentra mayoritariamente la forma levógira de los aminoácidos o L-aminoácidos, debido a la especificidad estereoquímica de las enzimas que utilizan sólo la L-enantiómeros para formar proteínas. La racemización de los aminoácidos en las proteínas producidas por organismos vivos se lleva a cabo sólo después de que el recambio proteico ha cesado.

Durante el curso del envejecimiento, las formas isoméricas L de los aminoácidos (L-aminoácido) se transforman, mediante racemización, a formas D (dextrógiro) de un aminoácido (D-aminoácido). A una temperatura de 25 °C, se necesitaría alrededor de 100.000 años para que todos los L-aminoácidos presentes en los tejidos vivos se sometieran a una racemización completa para

convertirlos en un D-aminoácido⁽²⁾. Por lo tanto, el grado de racemización de aminoácidos puede utilizarse para estimar la edad de los distintos tejidos. De todos los aminoácidos estables, el ácido aspártico tiene una de las más altas tasas de racemización y es por lo tanto, es el aminoácido más utilizado para la estimación de la edad.

Estas reacciones incluyen la racemización de los residuos aspartil y asparaginil⁽⁹⁾. El resultado, muy poco común, de forma D de ácido aspártico (ácido D-aspártico) se ha detectado en los hidrolizados de diferentes proteínas en diversos tejidos humanos⁽⁴⁾.

RACEMIZACIÓN DEL ÁCIDO ASPÁRTICO

El organismo humano utiliza principalmente L-aminoácidos en la síntesis de proteínas. En proteínas que son sintetizadas a temprana edad y que no son posteriormente alteradas, el ácido D-aspártico se puede acumular durante el envejecimiento⁽⁵⁻⁷⁾. Un aumento de ácido D-aspártico (que es directamente proporcional a la edad) se ha demostrado en varios tejidos, incluyendo la dentina y el esmalte dentales, discos intervertebrales, lente, cerebro, pulmones y huesos⁽⁸⁾. Entonces la utilización forense de la AAR está basada en la estimación de la proporción de D/L ácido aspártico en los tejidos con un lento metabolismo, como por ejemplo los tejidos dentarios⁽⁹⁾.

La AAR para la estimación molecular de la edad ha sido usada por un largo tiempo, los primeros estudios en tejidos dentarios, como el esmalte y la dentina fueron realizados hace más de 30 años⁽²⁾.

LA DENTINA COMO SUSTRATO PARA DATACIÓN

El tejido óptimo para la estimación de la edad sobre la base de AAR es la dentina dental, tejido que ha sido usado en múltiples estudios forenses, demostrando un resultado técnico que puede ser excelente⁽¹⁰⁻²²⁾. La dentina en su totalidad, así como extractos de proteínas dentinarias pueden ser analizadas⁽²³⁾.



En la fracción proteica no colágena y en la dentina completa, existe una relación muy estrecha entre la edad y el grado de AAR^(15,24).

La composición de la matriz orgánica de la dentina es suficientemente homogénea para permitir una determinación reproducible de la edad al momento de la muerte mediante el análisis del total o extractos crudos acídicos de dentina, sin más que la purificación de las proteínas permanentes que muestran una acumulación edad-dependiente de ácido D-aspártico.

Estas condiciones óptimas son atribuibles a la baja rotación de proteínas en la dentina, que es extremadamente braditrófica (de ritmo metabólico lento, debido a una ausencia de red vascular adecuadamente desarrollada). Las proteínas de la dentina son metabólicamente aisladas y mantenidas a una temperatura constante durante la vida. Cualquier forma degradada de las proteínas originales por lo tanto puede acumularse con el tiempo y el grado de degradación, (en este caso racemización), puede proporcionar un medio de determinación de la edad.

DATACIÓN POR RACEMIZACIÓN DEL ÁCIDO ASPÁRTICO EN DENTINA

El método, a diferencia de análisis morfológicos, no implica el mismo grado de error interobservador, ya que se basa en estimaciones objetivas, por lo tanto no se requiere formación especializada para aplicar la técnica⁽²⁵⁾.

La precisión de esta técnica puede ser excelente, estudios han demostrado que posee una exactitud de +/- 3 años^(13,20).

Las tasa de variación de los aminoácidos forma L a la forma D, al ser una reacción química de primer orden es influenciada por numerosos factores, tales como la conformación de las proteínas, la temperatura, el pH y la concentración de agua en el medio ambiente. La temperatura es un factor medioambiental importantísimo, se calcula que una temperatura media de 15°C por más de 10 años puede inducir un error de 0,2 años en la estimación de la edad dentinaria. En caso de cuerpos quemados, los errores pueden ser muchos

más altos, por una aceleración en la AAR⁽¹¹⁾. Además, largos intervalos postmortem pueden también alterar el proceso de AAR, a causa de la diagénesis de las proteínas y contaminación⁽²⁶⁾. Por lo tanto, la historia y condiciones postmortem de la muestra, intervalo post mortem, así como los protocolos de análisis de laboratorio deben ser aclarados antes de la suposición de la edad real al momento de la muerte⁽²⁷⁻²⁹⁾. Además, variaciones en los valores de racemización de ácido aspártico han sido informados de acuerdo al tipo de diente y su posición de éste en la boca^(10,27). Debido a la complejidad de la AAR, para mejorar la ejecución de la técnica y su aplicación forense, investigaciones recientes sugieren la introducción de mezclas estándar de D y L aminoácidos o nuevas estrategias de muestreo^(22, 30-31).

FACTORES INVOLUCRADOS EN EL ANÁLISIS DE LA RACEMIZACIÓN EN DENTINA

Una vez elegida la dentina para el análisis forense, se deben considerar los siguientes factores involucrados, que pueden ser agrupados en dos grupos: estrategia para la obtención de la muestra y preparación de la muestra.

ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El tipo de diente elegido para el análisis puede influir sobre los resultados de estimación de la edad al fallecer, ya que la edad de la dentina no es equivalente con la edad cronológica⁽³²⁾. El diente idealmente debe estar libre de caries para factibilidad técnica⁽²⁹⁾, porque las bacterias y procesos infecciosos pueden alterar los valores de AAR. Otro aspecto a considerar, es si la pieza dentaria ha estado presente en la cavidad oral durante un largo periodo, como es el caso de personas mayores que mantienen sus dientes, en estos casos la influencia del ambiente es más fuerte, además los dientes se hacen más débiles. El nivel promedio del ácido D-aspártico en cada diente disminuye de acuerdo al siguiente orden: primer molar > segundo molar > segundo premolar > primer premolar > canino > incisivo central > incisivo lateral⁽²⁷⁾. Como la formación de dentina se dirige desde la corona hacia el ápice,

la relación D / L de ácido aspártico es mayor en la corona y descende hacia el ápice radicular⁽¹⁰⁾. Las muestras no deben tocarse con las manos.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El principal objetivo de la preparación de una muestra es eliminar la contaminación que pudiese haber adquirido con anterioridad a su llegada al laboratorio. Esta es una de las etapas más críticas en todo el proceso de análisis químico de restos antiguos. El manejo de la muestra es de cuidado desde su fijación⁽³³⁾. Se recomienda el uso de etanol y formalina como medios de fijación estándar para la determinación de la edad a través del análisis de piezas dentarias⁽³⁴⁾. Se sabe que la formalina se une en los grupos amino, amida y guanidina⁽³⁵⁾. Otros autores no recomiendan el uso de fijadores de formol, ya que intervienen en la racemización obtenida durante la hidrólisis ácida de la dentina, lo que ocasiona la obtención de resultados poco reproducibles⁽³²⁾.

Blanqueamiento: El tejido blando adherido a los dientes es eliminado utilizando hipoclorito de sodio^(36,37). Esta medicación penetra en la dentina, causando oxidación selectiva, cuya exposición prolongada puede alterar la relación D/L de ácido aspártico⁽³²⁾.

Lavado: La manera en que las muestras son tratadas antes del análisis puede afectar la tasa de racemización obtenida. Las tasas de racemización del esmalte, reportadas por algunos autores fueron más altas que las tasas obtenidas por otros^(24,38). El primer lavado de la muestra es con acetona y el segundo con 0,2 M de HCl. Los aminoácidos de bajo peso molecular han sido eliminados por el lavado con ácido, pero no por la acetona. Las formas en que las muestras serán lavadas deben ser consistentes entre los estudios.

Pulverización de la dentina: La pulverización de los tejidos calcificados es a menudo utilizada en la preparación de muestras antes de la desmineralización y extracción de proteínas, donde particularmente se usa un agente quelante (EDTA) en lugar de un ácido mineral⁽³⁹⁾.

Fracción proteica analizada: La fracción soluble e insoluble son definiciones operacionales y la composición de ellas variará dependiendo del modo de extracción. La fracción insoluble se compone en su mayoría de colágeno helicoidal y por ende presenta una menor tasa de racemización. La fracción soluble de las proteínas es el componente de racemización rápida por lo tanto el más exacto para la estimación de la edad⁽⁴⁰⁾.

Desmineralización: Con el objeto de aislar una fracción de la proteína total dentinaria, la desmineralización es necesaria. Esto usualmente se consigue por un ácido mineral (HCl), o menos común por un agente quelante (EDTA). El método con EDTA requiere extraer en polvo la dentina para que sea conveniente (se requiere de dos semanas mínimo para que se observen cambios en la solución). La desmineralización con HCl es mucho más rápida y simple. Algunos autores han comparado las estrategias de desmineralización para tejido óseo, concluyendo que las piezas idealmente deben ser extraídas con 0,6 N HCl con continua agitación a 4 °C. Es esencial usar temperatura baja en la preparación, de otro modo ocurrirá la hidrólisis del enlace peptídico y con ello la racemización. Con esto los autores concluyen que el método con EDTA utiliza demasiado tiempo y no presenta ninguna ventaja en relación sobre el HCl⁽⁴¹⁾.

Hidrólisis: Típicamente la muestra de dentina es hidrolizada durante 6 horas usando 6 M HCl, sin embargo existen variaciones. Al aumentar los tiempos de hidrólisis se induce racemización y esto se debe tener en cuenta al comparar diferentes estudios. La energía de activación de hidrólisis es más alta que la de racemización^(32,42).

Separación cromatográfica: Tanto los métodos de cromatografía por gases de alta presión (HPLC)^(43,44), como cromatografía por gas (GC) son usados para separar y cuantificar D y L enantiómeros de ácido aspártico en dentina⁽⁴⁵⁾. Los investigadores usan la técnica a la que tienen acceso o en la que tienen mayor experiencia. El método original de intercambio iónico con HPLC tiene el inconveniente que requiere tiempos de elución de más de 1 hora y sólo el ácido aspártico



puede ser analizado⁽⁴⁶⁾. La GC es el método usado típicamente por estudios de ciencia forense. Las técnicas cromatográficas deberían dar los mismos resultados, sin embargo cada método tiene inconvenientes específicos.

Interpretación de los resultados (estimación de la edad mediante proporciones de D y L): La interpretación de los resultados debe basarse en los datos de calibración básica para cada laboratorio. Para la estandarización de procedimientos se recomienda: curvas individuales calibradas para cada tipo de diente, utilizar muestras descontaminadas, sumergir las muestras en hipoclorito de sodio, los dientes deben ser almacenados en aire seco a bajas temperaturas, evitar el lavado con soluciones ácidas, para desmineralizar se deben utilizar bajas temperaturas, y la pirólisis debe ser a 100 °C por 6 horas, utilizando 6 M HCl⁽⁴⁷⁾, el manejo de la temperatura debe ser cuidadoso, ya que la AAR es un proceso temperatura-dependiente⁽²⁹⁾. Los datos obtenidos de la literatura sólo se pueden utilizar para interpretación de los resultados si la calibración básica ha demostrado su aplicabilidad^(32,48). La estimación de la edad y el cálculo de los intervalos de confianza se puede realizar por medio de la predicción inversa⁽⁴⁹⁾.

DISCUSIÓN

El mecanismo de determinación de edad mediante AAR se ha presentado intencionalmente de manera muy general. Los laboratorios de análisis forense han desarrollado con el tiempo diferentes métodos para datación, sin lograr una unificación de criterios y técnicas, que procuren este método como una herramienta objetiva y cuatificable, y falta estandarizar los procedimientos. La realización de la técnica no estandarizada para el análisis forense de dientes, mediante los procedimientos descritos depende de la organización individual de cada laboratorio, lo que limita la comparación científica, reproducibilidad de resultados y la evaluación por pares.

Con el fin de perfeccionar el método se recomienda enfocarse en la química de base de estos procesos y realizar un protocolo estándar, teniendo en cuenta cualquier condición que

puadiese alterar la muestra, para así enfrentar de una manera más clara la resolución de problemas en datación.

REFERENCIAS

1. Alkass, K., Buchholz, B. A., Ohtani, S., Yamamoto, T., Druid, H. y K. L. Spalding. (2010). Age estimation in forensic sciences: application of combined aspartic acid racemization and radiocarbon analysis. *Mol Cell Proteomics* 9 (5), 1022-1030.
2. Helfman, P. M. y J. L. Bada. (1975). Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 2891-2894.
3. Clarke, S. (1987). Propensity for spontaneous succinimide formation from aspartyl and asparaginyl residues in cellular proteins. *Int. J. Peptide Protein Res*, 30, 808-821.
4. Ritz, S. y M. J. Collins. (2002). Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing Res. Rev*, 1, 43-59.
5. Geiger, T. y S. Clarke. (1987). Desamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. *J. Biol. Chem*, 262, 785-794.
6. Lowenson, J. y S. Clarke. (1988). Does the chemical instability of aspartyl and asparaginyl residues in proteins contribute to erythrocyte aging? *Blood Cells*, 14, 103-117.
7. Stephenson, R. C. y S. Clarke. (1989). Succinimide formation from aspartyl and asparaginyl peptides. *J. Biol. Chem*, 264, 6164-6170.
8. Ritz, S., Turzynski, A., Schütz, H. W., Hollmann, A. y G. Rochholz. (1996). Identification of osteocalcin as a permanent aging constituent of the bone matrix: basis for an accurate age at death determination. *Forensic Sci. Int*, 77 (1-2), 13-26.
9. Arany, S. y S. Ohtani. (2011). Age estimation of bloodstains: A preliminary report based on aspartic acid racemization rate. *Forensic Sci. Int*, DOI:10.1016/j.forsciint.2011.05.015
10. Ohtani, S. (1995). Estimation of age from dentin by using the racemization reaction of aspartic acid. *Am. J. Forensic Med. Pathol*, 16, 158-161.
11. Ogino, T., Ogino, H. y B. Nagy. (1985).



- Application of aspartic acid racemization to forensic odontology: post mortem designation of age of death. *Forensic Sci. Int*, 29, 259–267.
12. Ritz, S., Schütz, H. W. y B. Schwarzer. (1990). The extent of aspartic acid racemization in dentin: a possible method for a more accurate determination of age at death? *Z.Rechtsmed*, 103, 457–462.
 13. Ohtani, S. y K. Yamamoto. (1991). Age estimation using the racemization of amino acid in human dentin. *J. Forensic Sci*, 36, 792–800.
 14. Ohtani, S. y K. Yamamoto. (1992). Estimation of age from a tooth by means of racemization of an amino-acid, especially aspartic-acid – comparison of enamel and dentin. *J. Forensic Sci*, 37, 1061–1067.
 15. Ritz, S., Schütz, H. W. y C. Peper. (1993). Postmortem estimation of age at death based on aspartic-acid racemization in dentin – its applicability for root dentin. *Int. J. Legal Med*, 105, 289–293.
 16. Mörnstad, H., Pfeiffer, H. y A. Teivens. (1994). Estimation of dental age using HPLC technique to determine the degree of aspartic acid racemization. *J. Forensic Sci*, 39, 1425–1431.
 17. Ohtani, S. (1994). Age estimation by aspartic acid racemization in dentin of deciduous teeth. *Forensic Sci. Int*, 68, 77–82.
 18. Ohtani, S. (1995). Studies on age estimation using racemization of aspartic acid in cementum. *J. Forensic Sci*, 40, 805–807.
 19. Fu, S. H., Fan, C. C., Song, H. W. y Wei, F. Q. (1995). Age estimation using a modified HPLC determination of ratio of aspartic acid in dentin. *Forensic Sci. Int*, 73, 35–40.
 20. Ritz, S., Stock, R., Schütz, H. W. y H. J. Kaatsch. (1995). Age estimation in biopsy specimens of dentin. *Int. J. Legal Med*, 108, 135–139.
 21. Ohtani, S., Sugimoto, H., Sugeno, H., Yamamoto, S. y K. Yamamoto. (1995). Racemization of aspartic acid in human cementum with age. *Arch. Oral Biol*, 40, 91–95.
 22. Arany, S., Ohtani, S., Yoshioka, N. y K. Gonmori. (2004). Age estimation from aspartic acid racemization of root dentin by internal standard method. *Forensic Sci. Int*, 141, 127–130.
 23. Meissner, C. y S. Ritz. (2010). Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci Int*, 203 (1-3), 34-43.
 24. Helfman, P. M. y J. L. Bada. (1976). Aspartic acid racemisation in dentine as a measure of ageing. *Nature*, 262, 279-281.
 25. Gustafson, G. (1950). Age determination on teeth. *J. Am. Dent. Assoc*, 41, 45–54.
 26. Griffin, R. C., Chamberlain, A. T., Hotz, G., Penkman, K. E. y M. J. Collins. (2009). Age estimation of archaeological remains using amino acid racemization in dental enamel: a comparison of morphological, biochemical, and known ages-at-death. *Am. J. Phys. Anthropol*, 140, 244–252.
 27. Ohtani S, Ito R, Yamamoto T (2003). Differences in the D/L aspartic acid ratios in dentin among different types of teeth from the same individual and estimated age. *Int. J. Legal Med* 117:149–152.
 28. Ohtani S (2002). Technical notes for age estimation using the femur: influence of various analytical conditions on D-aspartic acid contents. *Int. J. Legal Med* 116:361–364.
 29. Griffin, R. C., Moody, H., Penkman, K. E., Fagan, M. L., Curtis, N. y M. J. Collins. (2008). A new approach to amino acid racemization in enamel: testing of a less destructive sampling methodology. *J. Forensic Sci*, 53, 910–916.
 30. Yekkala, R., Meers, C., Schepdael, A. V., Hoogmartens, J., Lambrichts, I. y G. Willems. (2006). Racemization of aspartic acid from human dentin in the estimation of chronological age. *Forensic Sci Int*, 159,(Suppl 1), 89–94.
 31. Ohtani, S., Abe, I. y T. Yamamoto. (2005). An application of D- and L-aspartic mixture as standard specimens for the chronological age estimation. *J Forensic Sci*, 50, 1–5.
 32. Waite, E. R., Collins, M. J. y A. C. Van Duin. (1999). Hydroxyproline interference during the gas chromatographic analysis of D/L aspartic acid in human dentin. *Int J Leg Med*, 112, 124-131.
 33. Offele, D., Harbeck, M., Dobberstein, R. C., Von Wurmb, N. y S. Ritz. (2007). Soft tissue removal by maceration and feeding of *Dermestes* sp.: impact on morphological



- and biomolecular analyses of dental tissues in forensic medicine. *Int. J. Legal Med*, 212, 341–348.
34. Ohtani, S., Hiroshi, O. y W. Asaka. (1997). Estimation of age from teeth by amino acid racemisation influence of fixative. *J Forensic Sci*, 42, 137-139.
 35. French, D. y Edsall, J. T. (1945). The reactions of formaldehyde with amino acids and proteins. *Adv. Protein Chem*, 2, 277–335.
 36. Gillard, R. D., Pollard, A. M., Sutton, P. A. y D. K. Whittaker. (1990). An improved method for age at death determination from the measurement of D-aspartic acid in dental collagen. *Archaeometry*, 32, 61–70.
 37. Carolan, V. A., Gardner, M. L. y A. M. Pollard. (1997). Age estimation via measurement of amino acid racemisation in dental tissue. In: a sinclair, *Journal of Gowlett* (Edition), *Proceedings of a conference on the application of scientific techniques to the study of archaeology. Archaeological Science 1995*, Oxford Oxbow Monograph, Vol.64, Oxbow Books, 1997. 349-357.
 38. Ohtani, S. y Y. Katsuichi. (1992). Estimation of age from a tooth by means of racemisation of an amino acid especially aspartic acid-comparison of enamel and dentin. *J Forensic Sci*, 37, 1061-1067.
 39. Waite, E. R., Collins, M. J., Ritz, S., Schutz, H. W., Cattaneo, C. y H. I. Borrman. (1997). A review of the methodological aspects of aspartic acid racemisation analysis for use in forensic science. *Forensic Sci Int*, 103, 113-124.
 40. Ohtani, S. y K. Yamamoto. (1990). Estimating age through the amino acid racemization of acid-soluble dentinal peptides. *Nihon Hoigaku Zasshi*, 44(4), 342-345.
 41. Carolan, V. A., Gardner, M. L., Lucy, D. y A. M. Pollard. (1997). Some considerations regarding the use of amino acid racemisation in human dentin as an indicator of age at death. *J Forensic Sci*, 42, 10-16.
 42. Csapó, J., Csapó, Z., Wagner, L., Talos, T., Martin, T. G., Folestad, S., Tivesten, A. y S. Nemethy. (1997). Hydrolysis of proteins performed at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L- amino acids, *Anal. Chim. Acta* 339, 99–107.
 43. Benešová, T., Honzátko, A., Pilin, A., Votruba, J. y M. Flieger. (2004). A modified HPLC method for the determination of aspartic acid racemization in collagen from human dentin and its comparison with GC. *J. Sep. Sci*, 27, 330–334.
 44. Dobberstein, R. C., Huppertz, J., von Wurmb, N. y S. Ritz. (2008). Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: Implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *Forensic Sci. Int*, 179, 181–191.
 45. Johnson, B. J. y G. H. Miller. (1997). Archaeological applications of amino acid racemisation. *Archaeometry*, 39, 265-287.
 46. Manning, J. M. y S. Moore. (1968). Determination of D- and L-amino acids by ion exchange chromatography as LD and LL dipeptides. *J. Biol. Chem*, 243, 5591-5597.
 47. Kumar, K. (2008). Dental age estimation using amino acid racemization. *Indian J Dent Res*, 19, 172-174.
 48. Ritz, S., Rochholz, G., Schutz, H. W., Collins, M. J., Waite, E. R., Cattaneo, C. y H. J. Kaatsch. (2000). Quality assurance in age estimation based on aspartic acid racemisation. *Int. J. Legal Med*, 114, 83–86.
 49. Zar, J. H. (1984). *Biostatistical analysis*. (2 ed). Prentice Hall, Englewood Cliffs, pp 276–277.