

INFORME DE RESULTADOS:

**EXPORTACIÓN DE MUESTRAS ARQUEOLÓGICAS CON FINES DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

Aprobado por Resolución Viceministerial N° 000247-2023-VMPCIC/MC

Correspondiente al “Proyecto de Investigación Arqueológica Santuarios de Altura del Sur
Andino”

Presentado por:

Lic. Winnie Celeste Martínez Sulca

COARPE N° 042026

Arequipa, octubre 2024

CONTENIDO

1. Resumen.....	03
2. Análisis toxicológicos.....	03
3. Análisis de ADN.....	05
4. Análisis de isótopos estables.....	06
5. Datación por radiocarbono.....	07
6. Lugar y procedencia de las muestras.....	09
7. Presentación y publicaciones.....	10

1. Resumen

El proyecto de exportaciones de muestras arqueológicas con fines científicos fue aprobado con Resolución Viceministerial N°000247-2023 el 13 de octubre del 2023 y está asociado al “Proyecto de Investigación Arqueológica Santuarios de Altura del Sur Andino”.

Este proyecto autorizó la exportación de quince (15) muestras arqueológicas provenientes de los volcanes de Ampato (Arequipa), Sara Sara (Ayacucho) y Pichu Pichu (Arequipa).

Esto con la finalidad de que sean sometidos a una serie de análisis: genéticos, toxicológicos e isotópicos. Asimismo, dado que estos fueron destructivos, se retiró la condición de bienes integrantes del Patrimonio Cultural de la Nación.

Durante la investigación de muestras del “Proyecto de Investigación Santuarios de Altura del Sur Andino” se logró identificar sustancias toxicológicas en el cabello y uñas, isótopos relacionados con el origen de los individuos examinados. En dos de los casos se obtuvieron resultados de pruebas genéticas de baja resolución.

Resultados

2. Análisis toxicológicos

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Medicina Forense de la Universidad Médica de Varsovia. M. Copérnico, Polonia. Se trata de una unidad con la que el Centro Andino de Investigaciones de la Universidad de Varsovia colabora desde hace mucho tiempo en el campo de análisis toxicológicos.

2.1. Material y métodos

Todas las sustancias certificadas y el estándar capilar Medidrug (material de referencia certificado) utilizados durante el desarrollo y validación del método se adquirieron de LGC Standards (Łomianki, Polonia) y Merck (Warszawa, Polonia). El metanol, el acetonitrilo y el ácido fórmico al 98-100 % eran de grado LC-MS y se adquirieron en Merck (Warszawa, Polonia).

2.2. Muestras de cabello y uñas

Las muestras de cabello y uñas de control sin drogas, utilizadas para el desarrollo y validación de métodos y la preparación de controles, se obtuvieron de personas que no consumieron ninguna droga.

2.3. Medición por LC-MS-MS

Las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo líquido Agilent Technologies serie 1200 conectado a un espectrómetro de masas Triple Quad 3460 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una interfaz de electropulverización. La separación de analitos se llevó a cabo en una columna de cromatografía Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 × 4,6 mm; 5 µm; Agilent Technologies) mantenida a 25 °C. El volumen de muestra inyectada fue de 10 µl. La fase móvil voló a través de la columna a una velocidad de 0,4 ml/min. La fase móvil consistía en ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v) y ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v) y se eluyó en las siguientes condiciones de gradiente (mostradas en relación con el contenido de acetonitrilo): 0 min-10 % , 6 min-100%, 7 min-10%, 14 min-10%. Como IS se utilizó diazepam-d5. Se utilizaron los siguientes parámetros del espectrómetro de masas: la temperatura del gas fue de 300 °C, el flujo de gas (nitrógeno) fue de 10 L/min y la presión del nebulizador fue de 40 psi. Se aplicó monitorización de reacciones múltiples (MRM) con detección de iones positivos. Se controlaron los iones precursores y tres iones producto de cada compuesto. Las transiciones, los voltajes del fragmentador, las energías de colisión y los tiempos de retención para cada compuesto se presentan en la Tabla 1. La adquisición e integración de datos LC-MS se realizaron utilizando el software MassHunter de Agilent Technologies (versión B.04.01).

2.4. Preparación de las muestras

Las muestras de cabello se prepararon según el procedimiento modificado descrito por Broecker (Broecker et al., 2012). En el caso de muestras de cabello arqueológicas más largas, se analizó el segmento proximal de 0 a 3 cm. Las muestras de cabello más corto se analizaron en toda su longitud. Antes del procedimiento de extracción, el cabello se descontaminó agitando suavemente (en el baño ultrasónico) durante 1 min con 5 ml de agua y luego tres veces durante 1 min con diclorometano (porciones de 5 ml). La solución de diclorometano obtenida tras el tercer lavado de las muestras arqueológicas se evaporó hasta sequedad a temperatura ambiente en corriente de nitrógeno. Los residuos de la evaporación se disolvieron en 100 µl de metanol y se analizaron para determinar la presencia de analitos provenientes de una posible contaminación externa. El cabello se secó sobre un papel de filtro a temperatura ambiente. El cabello seco se cortó con tijeras en trozos pequeños (1-2 mm) y se pulverizó. Se pesaron 20 mg de cabello molido en un vial Eppendorf de 1,5 ml y se combinaron con 50 µl del estándar interno (10 µg/ml de diazepam-D5). Se agregaron 0,5 ml de una mezcla de metanol/acetonitrilo/formiato de amonio 2 mm (25:25:50 v/v/v) a las muestras pulverizadas y

se incubaron durante 18 h con agitación a 37 °C. Después de enfriar, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 13 000 rpm. La fase líquida se evaporó hasta sequedad a una temperatura de 20-25 °C en la corriente de nitrógeno. Los residuos de la evaporación se disolvieron en 250 µl de metanol y se transfirieron a insertos para viales de muestreador automático para su inyección en el instrumento LC-MS-MS.

2.5 Los resultados

Compuesto	Ampato #1	Sara Sara
Cocaína	no detectado	1.5
Benzoilecgonina	no detectado	3.1
Cocaetileno	no detectado	no detectado
N,N-DMT	no detectado	no detectado
Harmina	0.6	no detectado
Harmalina	no detectado	no detectado
Mescalina	no detectado	no detectado
Bufotenina	no detectado	no detectado
Atropina	no detectado	no detectado

3) Análisis ADN

Los análisis de ADN de uñas y cabellos (Ampato 1 y Sara Sara) realizados en las muestras fueron de naturaleza destructiva. El ADN de las muestras se extrajo en el Laboratorio de ADN Antiguo de la Universidad de Viena siguiendo protocolos detallados adaptados al ADN_a (Dabney y Meyer 2019), donde se prepararon bibliotecas de doble cadena siguiendo protocolos dedicados diseñados para maximizar las posibilidades de recuperar moléculas de ADN a partir de ADN altamente degradado bibliotecas (Gamba et al. 2014). Después de la preparación de la biblioteca, cada muestra se capturó con cebos en solución que cubrían 1,41 millones de posiciones (cita retorcida) más cebos de ADN_{mt}. Esto permite la recuperación de suficientes

SNP para realizar análisis genéticos de poblaciones en muestras degradadas. Las muestras se agruparon y secuenciaron en lotes en carriles NovaSeq S1 en las instalaciones del Biocentro de Viena (VBCF).

Lamentablemente debido a la mala conservación no obtuvimos ningún resultado.

4) Análisis de isótopos estables

Se realizó el análisis isótopos de $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ de muestras de restos botánicos para reconstruir la procedencia de las muestras. La flora terrestre toma el carbono del CO_2 atmosférico. Mientras que el $\delta^{13}\text{C}$ depende también de una condición geográfica como la biosfera y la estación, o la latitud geográfica. El área densa de vegetación tiene una tasa más baja de ^{13}C debido a un intercambio de gases limitado. El valor final del carbono en las plantas depende principalmente del camino de la fotosíntesis (C_3 , C_4 y CAM) y de las condiciones ambientales específicas (disposición de agua, temperatura, humedad), pero también del tipo de estructura de la hoja de la planta (grosor de la capa superficial), fraccionamiento durante la fase gaseosa cuando el CO_2 se disuelve en la pared celular y se difunde a través del cloroplasto con agua, y discriminación durante la respiración. La influencia de los tres últimos, sin embargo, es limitada. El estudio de $\delta^{13}\text{C}$ en las plantas se puede utilizar para rastrear la perturbación climática pasada. Según fuentes de las crónicas, las capachos se realizaban durante calamidades naturales como por ejemplo la sequía.

Las plantas toman el nitrógeno del suelo en forma de nitrato (NO_3) y amoníaco (NH_4) y tienen valores bajos (entre 1-4 ‰). Sin embargo, el $\delta^{15}\text{N}$ podría verse afectado por los fertilizantes utilizados en los campos, como estiércol de camélido o el guano de aves marinas, que aumentan, respectivamente, los valores de las plantas cultivadas en 1,8 – 4,2‰ y 11,3 – 20,0‰. Las plantas cultivadas en lomas también tienen valores más altos de $\delta^{15}\text{N}$, entre 6 y 12‰. El análisis de $\delta^{15}\text{N}$ puede ayudar con investigaciones del clima y orígenes de las plantas, así como servir de base para el estudio de los individuos.

Las muestras fueron investigadas en cooperación con los laboratorios del Laboratorio de Análisis de Radioisótopos Ambientales Centro de Desarrollo Sostenible y Conservación de la Energía Facultad de Geología, Geofísica y Protección del Medio Ambiente Universidad AGH de Cracovia Miękinia 459, 32-065 Krzeszowice, Polonia. La determinación de las relaciones isotópicas del carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) se realizó utilizando un espectrómetro de masas de relación isotópica Delta Q funcionando en modo de flujo continuo. El medio de trabajo de dióxido de carbono se obtuvo por combustión y purificación de las muestras en un analizador elemental

IsoLink NC. La calibración del espectrómetro se realizó mediante el método multipunto (Copplen et al 2006). Se utilizaron como muestras de referencia IAEA-CH3, IAEA-CH6, IAEA-601 proporcionadas por el Organismo Internacional de Energía Atómica de Viena. El resultado se da en notación $\delta^{13}\text{C}$ (Copplen 2011). Las mediciones de cada muestra se realizaron dos veces. El resultado es la media de las dos mediciones. La incertidumbre absoluta de medición $u(\delta^{13}\text{C})$ se estimó utilizando el método B de acuerdo con las recomendaciones ISO (GUM:1995). $SD(\delta^{13}\text{C})$ es la desviación estándar de la media multiplicada por el coeficiente de Student-Fisher.

Muestra	$\delta^{13}\text{C}$, ‰ VPDB	$SD(\delta^{13}\text{C})$, ‰	$u(\delta^{13}\text{C})$, ‰
MT02	-11.228	0.052	0.10
MT03	-22.86	0.17	0.10
MT04	-21.9	1.2	0.10
MT05	-23.34	0.97	0.10
MT06	-26.251	0.072	0.10
MT08	-26.67	0.60	0.10
MT11	-21.173	0.068	0.10
MT11	-23.54	0.70	0.10
MT12	-9.82	0.23	0.10
MT13	-28.82	0.74	0.10
MT14	-25.613	0.029	0.10
MT15	-26.173	0.021	0.10

Debido al valor desproporcionado de los isótopos implicados en el análisis del ^{13}C , el análisis isotópico del ^{15}N no pudo realizarse en la cantidad de material disponible.

5) Datación por radiocarbono

La datación por radiocarbono es un método para determinar la edad de un objeto que contiene material orgánico utilizando las propiedades del radiocarbono, un isótopo radiactivo del carbono. El ^{14}C resultante se combina con el oxígeno atmosférico para formar dióxido de carbono radiactivo, que se incorpora a las plantas mediante la fotosíntesis; a continuación, los animales adquieren ^{14}C al comer las plantas. Cuando el animal o la planta muere, deja de intercambiar carbono con su entorno y, a partir de entonces, la cantidad de ^{14}C que contiene comienza a disminuir a medida que el ^{14}C sufre una desintegración radiactiva. La medición de la proporción de ^{14}C en una muestra de una planta o animal muerto, como un trozo de madera o un fragmento de hueso, proporciona información que puede utilizarse para calcular cuándo murió el animal o la planta. Cuanto más antigua es una muestra, menos ^{14}C , y dado que la vida

media del ^{14}C (el periodo de tiempo tras el cual la mitad de una muestra dada se habrá descompuesto) es de unos 5.730 años.

Las muestras para la datación por radiocarbono se prepararon en el Laboratorio Dendrocronológico de la Universidad AGH de Cracovia en colaboración con la Universidad Tecnológica de Gliwice. Tras seleccionar el material adecuado para el análisis del radiocarbono, todas las muestras preparadas se limpiaron y enjuagaron en agua desionizada. El pretratamiento químico de las muestras incluye el procedimiento ácido-base-ácido (ABA) (Jull et al. 2006). En el primer paso, todas las muestras se trataron con HCl al 2% a 75°C y, a continuación, se aclararon con agua desionizada hasta que fueron neutras. A continuación, las muestras se trataron con NaOH 1M a 75°C y se aclararon con agua desionizada hasta que quedaron neutras. Por último, las muestras se trataron de nuevo con HCl al 2% a 75°C y se aclararon con agua desionizada hasta que quedaron neutras. Tras el procedimiento ABA, las muestras se secaron y se prepararon para el siguiente paso. Para garantizar la calidad de los resultados, se añadieron muestras de control de material con un contenido de radiocarbono conocido a cada uno de los lotes de muestras preparados. Utilizamos muestras C2, C3 y vitrinita del OIEA (Krapiec et al. 2018) para controlar el fondo de todo el procedimiento. Todas las muestras de control también se prepararon con el método ABA.

Para la combustión a CO_2 , las muestras se transfirieron a ampollas de cuarzo precocidas (900°C) junto con CuO y Ag, se evacuaron a una presión de 10-5 mbar, se sellaron y se quemaron durante 4 h a 900°C en un horno de mufla (Krapiec et al. 2018). El CO_2 resultante se liberó al vacío y se purificó criogénicamente para su posterior grafitización. La reducción de CO_2 a grafito se realizó mediante un sistema de vacío de 5 puertos (Krapiec et al. 2018) utilizando H_2 y polvo de Fe como catalizadores. Se utilizaron unos 200 mbar de CO_2 (correspondientes a 1 mg de C en este sistema), y la relación H_2/CO_2 para la reducción fue de ~ 3 (en volumen), y la relación Fe/C de 2 (en masa). El agua producida durante este proceso se eliminó mediante una trampa criogénica.

A continuación, el grafito producido se prensó en el cátodo y se midió utilizando el sistema AMS del Centro de Estudios de Isótopos Aplicados de la Universidad de Georgia, Athens, Georgia, EE.UU. (Labcode UGAMS (Cherkinsky et al. 2010)). Los contenidos de ^{14}C se reportan como $\Delta^{14}\text{C}$ por mil (‰) desviaciones de la muestra estándar, 0,7459 NBS actividad de ácido oxálico (SRM- 4990C). La corrección de la edad, la corrección de la composición isotópica ($\delta^{13}\text{C}$, medida por el sistema AMS) y los valores de $\Delta^{14}\text{C}$ se calcularon utilizando las fórmulas presentadas por Stuiver y Polach (1977). Las proporciones $^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$ del grafito se

midieron utilizando el espectrómetro de masas con acelerador CAIS de 0,5 MeV. Las fechas citadas sin calibrar se han expresado en años radiocarbónicos anteriores a 1950 (años BP), utilizando la semivida del ^{14}C de 5568 años. El error se indica como una desviación estándar y refleja tanto errores estadísticos como experimentales. Todos los resultados con corrección de fondo.

Muestra	pMC	±	^{14}C edad BP	±
MT02	92.873	0.690	593	59
MT03	no detectado			
MT04	91.267	0.430	734	37
MT05	94.910	0.286	419	24
MT06	93.196	0.504	566	43
MT08	93.626	0.547	529	47
MT11	91.094	0.272	749	32
MT11	92.547	0.285	622	24
MT12	95.525	0.556	367	46
MT13	94.746	0.269	433	22
MT14	92.839	0.270	596	23
MT15	88.125	0.338	1015	30

6) Lugar y procedencia de las muestras

Las 15 (quince) muestras corresponden a material orgánico y óseo humano relacionados a los niños sacrificados y a sus contextos de entierro, procedentes de los volcanes Ampato (Arequipa), Pichu Pichu (Arequipa) y Sara Sara (Ayacucho). Todos estos recuperados en las distintas temporadas del “Proyecto de Investigación Arqueológica Santuarios de Altura de Sur Andino” entre 1995 a 1998, este último aprobado bajo las siguientes resoluciones:

- Resolución Directoral Nacional N° 352 del 27 de setiembre de 1995
- Resolución Directoral Nacional N°127 del 11 de abril de 1996.
- Resolución Directoral Nacional N°162-96-INC del 21 de junio de 1996
- Acuerdo N° 278 del 13 de octubre de 1997, Exp. N° 3257 del 19 de setiembre de 1997.

Todo este material se encuentra en custodia por parte del Museo Santuarios Andinos de la Universidad Católica de Santa María (Arequipa).

7. Presentación y publicaciones

Parte de los resultados obtenidos serán presentados en revistas peruanas y extranjeras indexadas.

Artículos científicos en preparación:

Socha, D. M., Fernández R., J. Reinhard, W. Martínez, G. Recagno Browning, F. Zigarán, M. Berenski, F. Grupp “Toxicological studies on the Inca frozen mummies from the Ampato, Sara Sara (Peru), Chuscha, Lulllaillaco, and Quehwar (Argentina) volcanos”

Socha, D. M., Siczowska D., Martínez W., Grupp F., Ancapichun S., Pawlyta J., Rakowski A. “High-precision dating approach for short-lived species from capacocha archaeological contexts”