

ANÁLISIS MEDIANTE FTIR DE LA CONSERVACIÓN DEL COLÁGENO Y LA POSIBLE CONTAMINACIÓN EN MUESTRAS ÓSEAS DEL CUATERNARIO PAMPEANO

FTIR ANALYSIS OF COLAGEN PRESERVATION AND POSSIBLE CONTAMINATION IN QUATERNARY BONES SAMPLES FROM THE PAMPAS

*Paula Vitale¹, Julia Tasca², Marcela Bax³, Ariadna Flores⁴, Gustavo G. Politis⁵
y Luciano Valenzuela⁶*

RESUMEN

En este trabajo se analizan los espectros FTIR (espectroscopia infrarroja mediante transformada de Fourier) de diferentes muestras de colágeno tipo I extraído de huesos de guanaco (*Lama guanicoe*) y venado de las Pampas (*Ozotoceros bezoarticus*) modernos y arqueológicos, con distintos grados de conservación de la proteína y algunas de ellas con aporte orgánico externo. También se determinó la relación C/N, %C, %N y rendimiento en la extracción de colágeno. Se analizaron 4 relaciones de porcentajes de transmitancia obtenidas sobre las bandas características de los espectros de colágeno (Amida III/Amida I, Amida III/Prolina, Prolina/Amida I, 1080 cm⁻¹/Amida I), las cuales se proponen como parámetros para determinar la calidad de colágeno. Como resultado, sostenemos que debido a que la técnica FTIR es muy versátil, brinda una herramienta de decisión simple, no demasiado costosa, rápida y accesible, permitiría establecer parámetros de calidad, determinar la conservación del colágeno en especímenes arqueológicos y seleccionar los mejores para realizar estudios isotópicos y radiométricos.

Palabras clave: Proteína ósea, contaminación del colágeno, análisis FTIR

1 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones Arqueológicas y Paleontológicas del Cuaternario Pampeano, Facultad de Ciencias Sociales. Centro de Investigaciones en Física e Ingeniería del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. pvitale@fio.unicen.edu.ar

2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Centro de Investigaciones en Física e Ingeniería del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. jtasca@fio.unicen.edu.ar

3 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones Arqueológicas y Paleontológicas del Cuaternario Pampeano, Facultad de Ciencias Sociales. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. laprei@soc.unicen.edu.ar

4 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones Arqueológicas y Paleontológicas del Cuaternario Pampeano, Facultad de Ciencias Sociales. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. laprei@soc.unicen.edu.ar

5 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones Arqueológicas y Paleontológicas del Cuaternario Pampeano, Facultad de Ciencias Sociales. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. gpolitis@fcnym.unlp.edu.ar

6 Laboratorio de Ecología Evolutiva Humana. Núcleo de Estudios Interdisciplinarios de Poblaciones Humanas de Patagonia Austral, Facultad de Ciencias Sociales. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. lucianoovalenzuela@gmail.com

Vitale et al, 2019. Análisis mediante FTIR de la conservación del colágeno y la posible contaminación en muestras óseas del cuaternario pampeano. *Anales de Arqueología y Etnología* 74, N°2, 169-189. Mendoza.

ABSTRACT

This paper analyzes FTIR (infrared spectroscopy by Fourier transform) spectra of type I collagen samples extracted from modern and archaeological bones of guanaco (*Lama guanicoe*) and Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) with varying degrees of protein conservation and, in some cases, external organic input. C:N atomic ratio, C%, N%, and collagen yield were determined. Four transmittance ratios from the spectra were analyzed: Amide III/Amide I, Amide III/Proline, Proline/Amide I, 1080 cm^{-1} /Amide I, which we propose be used for determining collagen quality. Since FTIR analysis is very versatile, it can be used as a simple decision-making tool, it is inexpensive, rapid, and available, we argue that establishing quality parameters with this method would allow us to determine collagen preservation in archaeological samples before sending them for isotopic and radiometric analyses and select the best samples.

Keywords: Bone protein, collagen contamination, FTIR

Recibido: 4/10/2019

Aceptado: 21/12/2019

INTRODUCCIÓN

Para los análisis radiométricos es primordial contar con una muestra adecuada del contexto arqueológico que se pretende datar, de tal forma que se minimicen las interferencias y los resultados sean confiables. Uno de los materiales más adecuados para ello es el hueso, sobre todo la fracción proteica que está formada por carbono y nitrógeno recolectado a lo largo de la vida del individuo (incorporada a la materia viva mediante la alimentación y la respiración). Por lo tanto, si la preservación de la muestra es buena el análisis isotópico brindará resultados confiables acerca de su antigüedad (Devièse *et al.*, 2018; Rubinos Pérez, 2009; Stafford *et al.*, 1988).

El material óseo está formado por una matriz mineral (mayoritariamente hidroxiapatita) y una matriz orgánica, que contiene proteínas, lípidos, hidratos de carbono, etc. La estructura proteica mayoritaria es el colágeno y, siempre y cuando su conservación sea adecuada, es la más confiable para realizar mediciones de cronología o fraccionamiento isotópico para inferir su dieta. Sin embargo, la composición original del hueso interactúa con los diferentes elementos exógenos presentes en el depósito sedimentario donde el material está enterrado, lo que influye en la preservación de la proteína ósea que finalmente se utiliza para las dataciones radiocarbónicas y para los análisis de isótopos estables.

Conocer la cantidad y calidad del colágeno extraíble de piezas óseas es fundamental para disponer de muestras adecuadas para estos análisis. La cantidad de colágeno generalmente se determina mediante el rendimiento de colágeno extraído (respecto de la masa inicial de hueso). Este parámetro se puede utilizar para estimar la calidad del colágeno extraído, ya que por debajo de cierto valor la calidad es generalmente mala. Para este rendimiento crítico Van Klinken (1999) sugiere 0,5-1% de colágeno extraíble, Ambrose (1990) lo establece en 3,5% y la mayoría de los laboratorios de análisis isotópicos rechazan muestras con menos del 1%. Sin embargo, este no es un indicador directo de la calidad de la proteína, porque no mide su composición ni la presencia de

compuestos contaminantes. Muestras con rendimientos mayores al 1% podrían no ser adecuadas para análisis isotópicos si presentan degradación de la proteína extraíble o agentes contaminantes como sustancias húmicas, preservantes, etc.

Los parámetros utilizados habitualmente para estimar la calidad de colágeno son la relación atómica C/N, %C y %N, los cuales miden de forma directa la composición de la proteína extraída. Sin embargo, para acceder a esta información se debería contar al menos con un analizador elemental. Este equipamiento es caro y está disponible en muy pocos laboratorios de arqueometría del país. Por este motivo se están investigando nuevas técnicas que permitan estimar la calidad de conservación del colágeno y/o su posible contaminación con sustancias del entorno mediante el uso de otras técnicas más versátiles y de fácil aplicación.

La proteína de hueso es mayoritariamente colágeno tipo I compuesto en más de un 50% por los aminoácidos Glicina, Prolina, Hidroxiprolina y Arginina. Este está constituido por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas (1.000 aminoácidos por cadena), agrupadas en una estructura helicoidal. La Glicina constituye la tercera parte de los aminoácidos de cada cadena, hecho único entre todas las proteínas del organismo. La repetición de 333 triplete de forma Gli-X-Y preside la estructura de cada una de las cadenas. En posición X se encuentra, en la mayoría de los casos, la Prolina; en posición Y, se encuentran la hidroxiprolina y la hidroxilisina, dos aminoácidos que no abundan en la constitución de las otras proteínas del organismo (Prockop y Guzmán, 1981). Se identifican en las estructuras de estos aminoácidos grupos funcionales OH, C=O, -NH₂, >NH, -NH⁺, ArNH, >CH₂, con características vibracionales específicas, las cuales son fácilmente detectables mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). La calidad del colágeno óseo condiciona la exactitud de los resultados de los análisis isotópicos para determinar su cronología o inferir aspectos de su dieta (Ambrose, 1990; Van Klinken, 1999).

En un principio se utilizó el contenido de nitrógeno (%N) determinado sobre hueso para establecer el grado de conservación de la fracción orgánica de los huesos, y se clasificó la calidad de las piezas en cinco categorías (Stafford *et al.*, 1988). Este parámetro no brinda una dimensión real de la calidad del colágeno, sino más bien el contenido de nitrógeno total del hueso (asociado a proteínas y aminoácidos). El parámetro establecido por De Niro (1985) y Ambrose (1990) es la relación atómica de Carbono y Nitrógeno (C/N). Un colágeno con buena calidad de conservación y un adecuado procedimiento de extracción debería tener una relación $2,9 < C/N < 3,6$. De Niro (1985) trabajó sobre una muestra de $n = 172$: 69 muestras de huesos frescos de animales, 40 de humano moderno y 63 piezas arqueológicas; y Ambrose (1990) lo hizo sobre una muestra de $n = 359$ compuesta por huesos humanos históricos y prehistóricos y de mamíferos no humanos modernos y prehistóricos. Unos años después Van Klinken (1999) ajustó este rango a un intervalo más pequeño ($3,1 < C/N < 3,5$) utilizando un número de muestras varias veces mayor ($n = 2146$) al utilizado por De Niro y Ambrose y sumó como nuevo parámetro el $\%C = 34,8 \pm 8,8$.

Si bien estos indicadores brindan información confiable acerca de la calidad de conservación del colágeno, para obtenerlos es necesario contar con equipamiento específico (un analizador elemental, EA) que generalmente no está disponible en los laboratorios. Por lo tanto, la calidad habitualmente se conoce en forma simultánea con los resultados de los análisis isotópicos. Conocer la calidad del colágeno en forma previa permitiría seleccionar las mejores muestras para realizar un análisis isotópico, lo cual ahorraría tiempo y dinero. Es por esta causa que se propone en este trabajo la utilización de una técnica más versátil.

Una de las alternativas posibles es el análisis por FTIR (espectroscopía infrarroja mediante transformada de Fourier) que se usa para la determinación de estructuras químicas y que permite semi-cuantificar compuestos en diversas matrices. La espectroscopía FTIR es utilizada en laboratorios académicos, industriales y forenses para dilucidar la composición de sólidos, líquidos y gases. El uso más común es en la identificación de materiales desconocidos o el monitoreo de materiales de producción industrial. La técnica es muy sensible y la información que brinda resulta tan específica que permite una discriminación fina entre dos matrices similares. Además, el análisis FTIR se realiza de forma rápida ya que una determinación concluye en unos pocos minutos.

La técnica consiste en hacer pasar la radiación infrarroja a través de una muestra: parte de la radiación es absorbida por la muestra y otra parte la atraviesa (se transmite). La señal resultante es un espectro que representa una huella digital molecular de la muestra. La utilidad de la espectroscopía infrarroja surge porque diferentes estructuras químicas (moléculas) producen diferentes huellas dactilares espectrales. Para el análisis de muestras líquidas y gaseosas la técnica es no destructiva, en tanto que para el análisis de sólidos se necesita una cantidad mínima de muestra que se mezcla con un diluyente también sólido y se conforma una pastilla sobre la cual se realiza el análisis.

Esta técnica fue aplicada en otros campos, como la medicina, para diferenciar colágeno tipo I (presente en hueso) de los tipos III, IV, V y VI (Belbachir *et al.*, 2009) y en la determinación del efecto de la luz UV y agentes oxidantes sobre la degradación del colágeno de la piel (Metreveli *et al.*, 2010). D'Elia y colaboradores (2007) utilizaron la técnica FTIR para identificar contaminantes típicos de contextos arqueológicos (ácidos húmicos, tinta de marcador permanente, Paraloid y calcita) sobre muestras óseas que pudieran representar un aporte de $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$ exógeno. Estos análisis permitieron identificar bandas vibracionales características de algunos contaminantes sobre hueso moderno.

Riaz y colaboradores (2018) en su revisión sobre la aplicación de FTIR a colágenos naturales y sintéticos reportaron la relación entre la intensidad de algunas bandas (Amida III/Amida I y Amida III/Prolina). La relación entre Amida III/Prolina es cercana a 1 cuando la estructura helicoidal de la macromolécula se encuentra bien conservada. Estas relaciones fueron utilizadas a fin de establecer la desnaturalización de las proteínas por efectos térmicos, cuando se reduce la estructura helicoidal. También reportaron valores característicos de estas relaciones para colágeno tipo I proveniente de diferentes fuentes. El alcance de este estudio es mostrar que la espectroscopia FTIR es una técnica analítica

muy útil (además de versátil) para diferenciar calidades de colágenos extraídos con fines cronológicos o de análisis isotópicos en general.

Por último, conocer la cantidad y calidad de colágeno es de vital importancia en los sitios arqueológicos y paleontológicos de la región pampeana debido a las dificultades que presentan las muestras óseas de estos sitios con respecto a la conservación del colágeno. Este es un problema recurrente tanto en sitios muy antiguos como Arroyo Seco 2 (ver discusión en Politis y Steele, 2014) como en aquellos localizados en los depósitos fluvio-lacustres de los ríos pampeanos (Gutiérrez *et al.*, 2011). Esta situación ha generado que muchas muestras de hueso enviadas para datar no tengan colágeno suficiente o de calidad adecuada para obtener resultados confiables. En muchos casos, los ambientes de planicie de inundación con alto contenido de materia orgánica, en los que se obtienen muestras con cantidades relativamente bajas de colágeno, favorecen la contaminación por ácidos húmicos y fúlvicos (ver discusión para el sitio Campo Laborde en Politis *et al.*, 2019 a). Esta contaminación ha generado en la mayoría de los casos un rejuvenecimiento de la edad real de muerte del organismo y en casos más extremos ha producido dataciones absolutamente anómalas (ver por ejemplo el caso de Paso Otero 5, Martínez, 2006; Martínez *et al.*, 2011).

METODOLOGÍA

El procedimiento para la extracción de colágeno se realizó según el método de Longin (1971) modificado. Cada muestra de hueso de aproximadamente 1 gr fue descalcificada con HCl 0,6 M a 4 °C. Seguidamente se lavó con NaOH 0,1 M para la eliminación de contaminantes solubles en álcali y se realizaron tres lavados en agua tridestilada para la eliminación de sales. La gelatinización se realizó en HCl 0,06 M a 85 °C durante 24 horas. Finalmente el colágeno disuelto se filtró (fibra de vidrio, 0,45 µm). La solución se liofilizó a -60 °C, 30 Pa hasta peso constante para la obtención de la muestra seca.

Se realizaron extracciones de colágeno de diferentes muestras óseas modernas y arqueológicas de guanaco (*Lama guanicoe*) y venado de las Pampas (*Ozotoceros bezoarticus*). Se registró el rendimiento de colágeno extraído respecto de la masa inicial de hueso procesada (% colágeno) y se midieron sobre los colágenos extraídos otros parámetros de calidad característicos tales como la relación atómica C/N, %C, %N y $\delta^{13}\text{C}$.

Muestras óseas	Cantidad
Arqueológicas	23 guanaco
Modernas	12 venado y 10 guanaco

Tabla 1: Muestras analizadas (n_{total} = 45).

El análisis por FTIR se realizó sobre las 45 muestras seleccionadas mediante la preparación de pastillas con 0,002 g de colágeno y 0,150 g de KBr como diluyente. Los espectros se midieron con un instrumento Magna 550 de Nicolet equipado con óptica de CsI.

Para identificar cualitativamente la calidad del colágeno extraído e identificar posibles contaminantes, los espectros de cada uno fueron comparados con un colágeno patrón (identificado como C1, Metapodio de Guanaco, moderno, Sitio Cinco Chañares, Provincia de Río Negro, con un porcentaje de colágeno extraído = 21% y una Relación C/N = 3,26).

Para establecer parámetros de calidad se evaluaron los espectros FTIR de los colágenos con relación C/N óptima entre 3,1 y 3,5 (Van Klinken, 1999). En este caso, el número de muestras con relación C/N óptima fue $n = 25$ (6 de guanaco arqueológico, 7 de guanaco moderno y 12 de venado moderno). Para obtener las relaciones entre bandas características de colágeno tipo I se tuvo en cuenta la relación entre los porcentajes de transmitancias (ReT%) para diferentes números de onda característicos para Amida I, Prolina, Amida III y la banda en 1080 cm^{-1} característica para los restos hidrocarbonados. Debido a que no hay bandas de absorción identificadas a 2000 cm^{-1} en ninguno de los espectros analizados, esta se toma como referencia para relativizar las mediciones de %T.

Finalmente, se compararon los valores de las ReT% obtenidas de los espectros FTIR para colágenos de diferente grado de conservación (respecto de la relación C/N), con evidencias de contaminación o con diferentes rendimientos de colágeno extraído.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación cualitativa de la calidad de colágeno extraído.

En la Figura 1 se observa la superposición de los espectros de colágenos bien conservados (cuyos parámetros de calidad son los esperables: rendimiento de colágeno mayor a 1% y relación C/N entre 2,9 y 3,6) (C1 y C4) y un colágeno que no presenta signos de degradación proteica porque tiene muy buen rendimiento de colágeno y buen aspecto visual, pero que muestra una relación C/N menor a la esperada (C5). En la Figura 2 se muestra la superposición de espectros con mala conservación (rendimientos de colágeno menores a 1% y relación C/N mayor a 3,6 compatible con la pérdida de nitrógeno proteico y/o aumento de carbono por aporte exógeno), ambos comparados con el extraído de un hueso moderno de guanaco.

En la Figura 1 se puede observar la coincidencia de los espectros con los reportados en bibliografía (Gianfrate *et al.*, 2007; Vidal y Mello, 2011). La banda de Amida A asociada a la frecuencia del estiramiento N-H usualmente se encuentra en 3330 cm^{-1} . La banda Amida B aparece como un hombro a 3079 cm^{-1} asociada al estiramiento N-H libre. A 2959 cm^{-1} aparece otra banda asociada a estiramiento C-H. Luego, en 1659 cm^{-1} se encuentra la banda Amida I asociada mayoritariamente a enlaces C=O no equivalentes (Vibración del C=O (80%), estiramiento C-N (10%), deformación N-H (10%)) usualmente reportada en la región de $1650\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$. En 1545 cm^{-1} se observa la banda Amida II (deformación C-N (40%) y estiramiento N-H (60%)), en 1451 cm^{-1} se encuentra la banda mayoritariamente de Prolina superpuesta con frecuencias características de las deformaciones -CH_2 y -CH_3 , pero reportada con este nombre anteriormente en la bibliografía (D'Elia *et al.*, 2007).

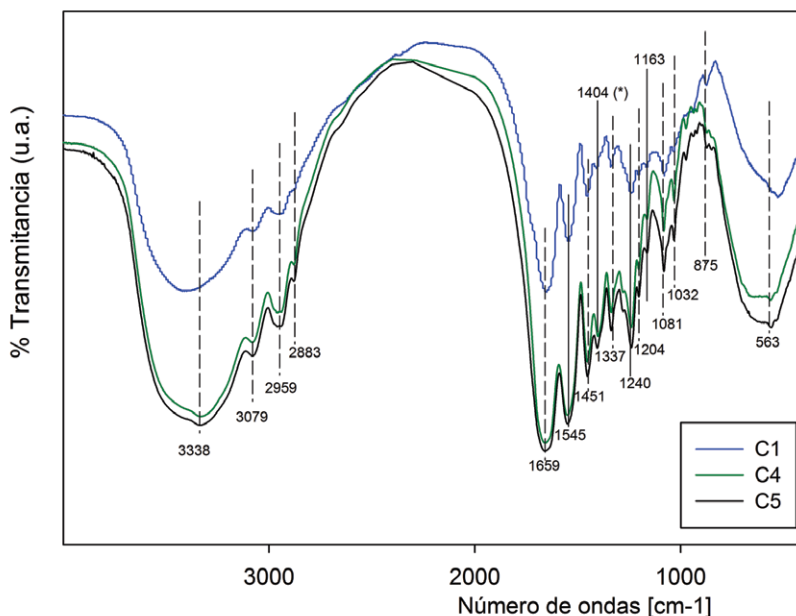


Figura 1. Comparación de espectros FTIR de colágenos bien conservados. C1: Metapodio, moderno, Pcia. de Río Negro (sitio Cinco Chañares). Rendimiento: 21%. Relación C/N: 3,26. C4: Instrumento de hueso, Guanaco, Pcia. de San Luis (sitio Las Vertientes). Rendimiento: 6,7%. Aspecto del colágeno: bueno. Relación C/N: 3,33. C5: Pieza 677/13054, Muestra de la Colección Ameghino de Cañada Rocha, MNLP. Rendimiento: 18,44%. Aspecto del colágeno: bueno. Relación C/N: 2,84, valor por debajo del recomendado para datar según Ambrose (1990). Se sospecha contaminación con alguna sustancia preservante agregada a la pieza que podría aportar nitrógeno orgánico (no colágeno). Banda marcada como *.

En 1337 cm^{-1} se ve una banda de intensidad media asociada a estiramientos C-N. En 1240 cm^{-1} se encuentra la banda característica Amida III correspondiente a la deformación N-H asociada a aminas terciarias, aminas cíclicas y estiramiento del enlace $\text{C}_{\text{alifático}}-\text{N}$. Entre 1100 y 1005 cm^{-1} se encuentran bandas de baja intensidad asociadas a las deformaciones C-O-H, C-O y C-O-C de restos de carbohidratos y torsiones fuera de plano de ácidos carboxílicos (Belbachir *et al.*, 2009; Riaz *et al.*, 2018). En los espectros analizados se identifica un máximo para esta región en 1080 cm^{-1} . En 1404 cm^{-1} aparece una banda adicional en la muestra C5, posiblemente asociada al aporte externo de nitrógeno en esa muestra que tiene una relación C/N anómala (Politis *et al.*, 2019 b), ya que esta banda no es característica del colágeno tipo I.

En la Figura 2, donde se comparan los colágenos con mala conservación, se puede apreciar en rasgos generales una disminución de las bandas características para enlaces nitrogenados, la desaparición en algunos casos de las bandas Amida II y Amida III, y un aumento considerable de la intensidad de las bandas asociadas a restos de carbohidratos ($1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$). En la muestra C6 (Figura 2) se observa además una banda en 2404

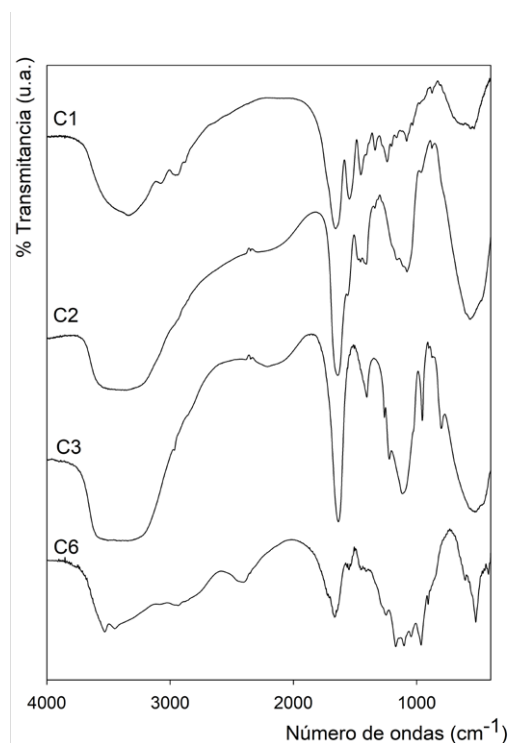


Figura 2. Comparación de espectros de colágenos mal conservados (C2, C3 y C6) respecto de C1 bien conservado. C2: Vértebra, edad esperada 400-800 años AP, Pcia. de Buenos Aires (sitio Zoco Andí 1). Rendimiento: 0,15%. Mala conservación evidente en colágeno. C3: Escápula, edad esperada 2000 años AP, Pcia. de Buenos Aires (sitio Empalme Querandíes 1). Rendimiento: 0,88%. Mala conservación evidente en colágeno. C6: Colágeno de pieza 13033. Muestra de la Colección Ameghino de Cañada Rocha, MNLP. Rendimiento: 0,35%. Aspecto de colágeno: mal conservado. No fue posible determinar la relación C/N. Se sospecha contaminación con alguna sustancia preservante.

cm^{-1} que podría asociarse a la presencia de sales de aminas terciarias NH^+ (Lin-Vien *et al.*, 1991), producto de la ruptura de enlaces peptídicos confirmados por la desaparición de la banda Amida III. Esto se asocia directamente a la pérdida de calidad del colágeno por aumento de la relación atómica C/N. Los huesos con relaciones C/N superiores a 3,6 no deben ser utilizados para establecer cronologías ni para análisis de isótopos estables.

Se sospecha que las muestras C5 (Figura 1) y C6 (Figura 2) fueron tratadas con alguna sustancia conservante que modificó la relación atómica C/N (por aporte de nitrógeno orgánico) ya que corresponden a una colección que desde 1879 circuló por varios museos y sufrió tratamientos diversos (Politis *et al.*, 2019 b).

En los espectros analizados no se identifican bandas características diferentes a las del colágeno o sus productos de degradación, a excepción de una pequeña señal de baja intensidad en 1404 cm^{-1} presente en C5 (Figura 1) y posiblemente en C6 (Figura

2), aunque este último corresponde a un colágeno mal conservado y la señal no es clara en esa región. Esta señal puede deberse a alguna sustancia como por ejemplo quitosano (material utilizado como conservante y antifúngico extraído de las cáscaras de crustáceos, señales características 1404, 1560, 2878 y 3352 cm^{-1}), aunque no puede confirmarse por FTIR debido a que las demás señales características se superponen con las del colágeno (Riaz *et al.*, 2018).

Parámetros de semi-cuantificación de calidad en colágenos extraídos.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para el lote completo de muestras analizadas con la finalidad de semi-cuantificar la calidad de los colágenos extraídos.

En general, para el conjunto completo de muestras modernas a las cuales se les determinó la relación C/N, esta dio valores óptimos en el intervalo recomendado por Van Klinken (1999). Sin embargo, la proporción de carbono para todo el conjunto dio un poco mayor a la reportada por él como óptima. El conjunto de muestras modernas se considera libre de contaminantes y efectos diagenéticos por lo que no se toma en cuenta el intervalo de %C entre 26% y 43,6% como un parámetro definitivo para determinar la calidad y se supone que quizás este intervalo podría ser un poco más amplio para muestras actuales. Sin embargo, se determinó que cuando el contenido de carbono es mucho mayor (como la muestra 3) se evidencian algunos cambios en los espectros FTIR, sobre todo en las relaciones de algunas bandas.

Los valores de las ReT% obtenidos de los espectros de colágenos con relación C/N óptima (entre 3,1 y 3,5) dan muy poca dispersión ($n = 24$, muestras 1-2, 4-25), a excepción de los correspondientes a la muestra 3, marcados en las Figuras 3 a 6 con color naranja. La muestra 3 tiene una relación C/N 3,33 (aceptable) pero un %C (52,40%) muy superior al recomendado por Van Klinken (1999). Esta muestra fue excluida de la determinación de los valores óptimos para las ReT%. Los valores medios y parámetros de dispersión se detallan en la Tabla 3.

Los valores de las ReT% tienen un estrecho rango de valores cuando la relación C/N se encuentra entre 3,1 y 3,5. Sin embargo, al aumentar $C/N > 3,6$, el valor de estas relaciones (o al menos una de ellas, ver Tabla 2, Figura 7) da valores por fuera del intervalo de la Tabla 3.

Al analizar el comportamiento de estas ReT% con otros parámetros de calidad como C/N, %C, %N y $\delta^{13}\text{C}$ se aprecia cierta estabilidad en los colágenos con relaciones C/N aceptables (Figuras 3, 4, 5 y 6). La muestra 3, en color naranja, si bien presenta una relación C/N dentro del rango óptimo y un rendimiento de colágeno por encima de los valores considerados críticos, tiene contenidos de carbono y nitrógeno mayores a los del resto del conjunto de muestras. Probablemente esta muestra sería descartada respecto a la confiabilidad de un análisis isotópico por estos parámetros. Esta muestra en particular da valores de ReT% fuera del rango propuesto para muestras con calidad adecuada, sobre todo para las ReT% Amida III/Amida I (Figura 3), Prolina/Amida I (Figura 5) y 1080 cm^{-1} /Prolina (Figura 6).

La relación Amida III/Amida I representa indirectamente una relación entre el carbono y el nitrógeno presente en el colágeno, ya que la banda Amida I está asociada mayoritariamente a los enlaces C=O mientras que la Amida III lo está a los estiramientos N-H de aminas. En la Figura 3d no se aprecian tendencias respecto de la proporción de $\delta^{13}\text{C}$. Sin embargo, se observa un leve crecimiento de la relación a medida que aumenta la proporción de nitrógeno y de carbono (Figuras 3b y c) que se refleja en la relación C/N de forma inversamente proporcional (Figura 3a, excepto el dato mostrado en naranja que corresponde a una muestra de calidad cuestionable).

La relación Amida III/Prolina se utiliza principalmente como indicador de que la estructura helicoidal del colágeno está bien conservada y su valor tiende a ser cercano a la unidad (Riaz *et al.*, 2018). La Prolina es uno de los aminoácidos mayoritarios y también el que se ve más afectado cuando la estructura helicoidal se rompe. Esto fue reportado previamente por Stafford *et al.* (1991) en un trabajo donde comparó la composición de aminoácidos en el colágeno extraído de huesos y piezas dentarias con diferentes grados de conservación. Si bien esta banda se asoció al nombre Prolina en trabajos anteriores (D'Elia *et al.* 2007), se sabe que esa frecuencia se asocia a otros grupos funcionales presentes en los aminoácidos que contribuyen a la misma. De todos modos, la pérdida del aminoácido debe reflejarse como reducciones en la intensidad de ese pico, por lo que en este trabajo decidimos mantener el nombre dado anteriormente. En las Figuras 4a, b, c y d se puede observar que no hay tendencias, ni variaciones significativas, de la relación Amida III/Prolina cuando se tienen relaciones C/N óptimas.

La relación Prolina/Amida I, por su parte, se puede asociar a la conservación del aminoácido más lábil respecto del contenido de carbono. Esta relación tiene más variabilidad que Amida III/Amida I y Amida III/Prolina (Figuras 5a, b, c y d), ya que es más sensible a cambios no solo en el contenido de nitrógeno y de carbono del colágeno sino también en la integridad estructural del mismo.

Muestra Patrón	Código laboratorio	Tipo hueso	Taxón	Condición	% Col	C/N	C%	N%	δ13C
1	PSUAMS#5967	Metapodio	Guanaco	Actual	21	3,26			
2	MSR 1177 (C4)	instrumento de hueso	Guanaco	Arqueológico	5,67	3,29	26,6	9,4	-16,8
3	PSUAMS#5738	Instrumento	Guanaco	Arqueológico	6,7	3,33	44,9	15,83	-19,04
4	PSUAMS#6963	fémur derecho	Guanaco	Arqueológico	3,4	3,33	52,4	18,3	-17,4
5	PSUAMS#6964	mandíbula	Guanaco	Arqueológico	15,39	3,14	23,9	8,9	-19,5
6	PSUAMS#6964	Radiocúbito	Guanaco	Arqueológico	4,24	3,16	22,9	8,4	-17,8
7	MSR 1155	Radiocúbito	Guanaco	Arqueológico	0,42	3,14	18	6,7	-17,4
8	MSR 1156	Hemimandíbula	Venado de las Pampas	Actual	-	3,2	38,16	13,92	-22,24
9	MSR 1157	Costilla	Venado de las Pampas	Actual	-	3,25	44,25	15,85	-22,37
10	MSR 1158	Costilla	Venado de las Pampas	Actual	-	3,27	42,97	15,34	-20,69
11	MSR 1159	Costilla	Venado de las Pampas	Actual	-	3,29	43,59	15,46	-20,24
12	MSR 1160	Costilla	Venado de las Pampas	Actual	-	3,24	45,29	16,3	-21,78
13	MSR 1161	Falange I	Venado de las Pampas	Actual	-	3,31	45,9	16,17	-20,48
14	MSR 1162	Costilla	Venado de las Pampas	Actual	-	3,26	44,13	15,81	-18,93
15	MSR 1163	Costilla	Venado de las Pampas	Actual	-	3,24	44,44	15,99	-20,8
16	MSR 1164	Atlas	Venado de las Pampas	Actual	-	3,29	44,84	15,89	-20,26
17	MSR 1165	Cráneo	Venado de las Pampas	Actual	-	3,24	43,38	15,64	-17,32
18	MSR 1166	Cráneo	Venado de las Pampas	Actual	-	3,29	44,68	15,86	-21,51
19	MSR 1167	Cráneo	Venado de las Pampas	Actual	-	3,28	44,75	15,92	-17,59
20	MSR 1168	Costilla	Guanaco	Actual	-	3,26	43,71	15,65	-21,86
21	MSR 1169	Costilla	Guanaco	Actual	-	3,37	43,94	15,22	-22,23
22	MSR 1170	Costilla	Guanaco	Actual	-	3,3	44,64	15,77	-22,27
23	MSR 1171	Costilla	Guanaco	Actual	-	3,29	47,35	16,77	-22,05
			Guanaco	Actual	-	3,26	44,56	15,96	-22,01

Tabla 2: Muestras analizadas y parámetros obtenidos de calidad de colágeno.

24	MSR 1172	Costilla	Guanaco	Actual	-	3,25	47,79	17,15	-22,13
25	MSR 1173	Costilla	Guanaco	Actual	-	3,29	43,94	15,59	-21,39
26	LI 0020	metacarpo	Guanaco	Actual	7,01	-	-	-	-
27	LI 0021	metacarpo	Guanaco	Actual	13,03	-	-	-	-
28	LI 0027	metacarpo	Guanaco	Actual	8,12	-	-	-	-
29	LI 0029	Falange	Guanaco	Arqueológico	13,68	-	-	-	-
30	LI 0032	Húmero	Guanaco	Arqueológico	6,02	-	-	-	-
31	LI0057	Falange	Guanaco	Arqueológico	1,86	-	-	-	-
32	MSR - 1059 (C5)	C. Cañada Rocha pieza 677/13054	Guanaco	Arqueológico	14,26	2,84	48,19	16,97	-16,08
33	MSR - 1056	C. Cañada Rocha pieza 690/13089	Guanaco	Arqueológico	9,31	2,83	43,4	15,31	-19,56
34	MSR - 1058	C. Cañada Rocha pieza 705/13554	Guanaco	Arqueológico	3,74	2,62	15,48	5,9	-18,52
35	LI0172	C. Cañada Rocha pieza 520/13055	Guanaco	Arqueológico	15,37	-	-	-	-
36	MSR - 1057	C. Cañada Rocha pieza 595/13571	Guanaco	Arqueológico	13,98	2,9	44,13	15,22	-20,09
37	MSR - 1055 (C6)	C. Cañada Rocha pieza 13033	Guanaco	Arqueológico	0,12	-	-	-	-
38	LI0169 (C2)	Vértebra	Guanaco	Arqueológico	0,15	4,3	-	-	-
39	LI0170 (C3)	Escápula	Guanaco	Arqueológico	0,88	3,9	-	-	-
40	LI 0171	Escápula	Guanaco	Arqueológico	5,59	-	-	-	-
41	LI0014	Fémur (tejido trabecular)	Guanaco	Arqueológico	0,48	-	-	-	-
42	LI0015	Fémur (tejido cortical)	Guanaco	Arqueológico	0,17	-	-	-	-
43	LI0031	Escápula	Guanaco	Arqueológico	0,08	-	-	-	-
44	LI0034	Hueso largo	Guanaco	Arqueológico	0,85	-	-	-	-
45	LI0037	Húmero	Guanaco	Arqueológico	0,34	-	-	-	-

Tabla 2: Muestras analizadas y parámetros obtenidos de calidad de colágeno (continuación).

Relación de porcentaje de Transmitancias	Valor medio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Amida III/Amida I	0,7125	0,0294	0,0412
Amida III/Prolina	0,9029	0,0113	0,0126
Prolina/Amida I	0,7891	0,0315	0,0399
1080 cm ⁻¹ /Prolina	0,5673	0,0437	0,077

Tabla 3: Valores característicos de relación de porcentajes de transmitancia para 24 muestras de colágeno con C/N entre 3,1 y 3,5. (12 de venado de las Pampas/moderno, 7 de guanaco/moderno y 5 de guanaco arqueológico).

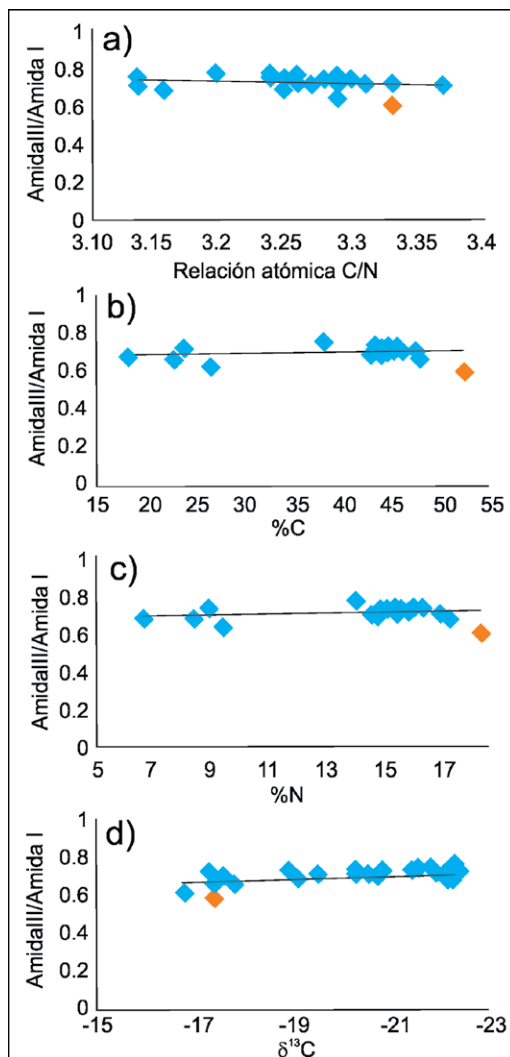


Figura 3: ReT% Amida III/Amida I para colágenos de calidad óptima (con relación C/N en el rango recomendado por Van Klinken (1999)) respecto de otros parámetros de calidad reconocidos (relación C/N, %C, %N, $\delta^{13}\text{C}$).

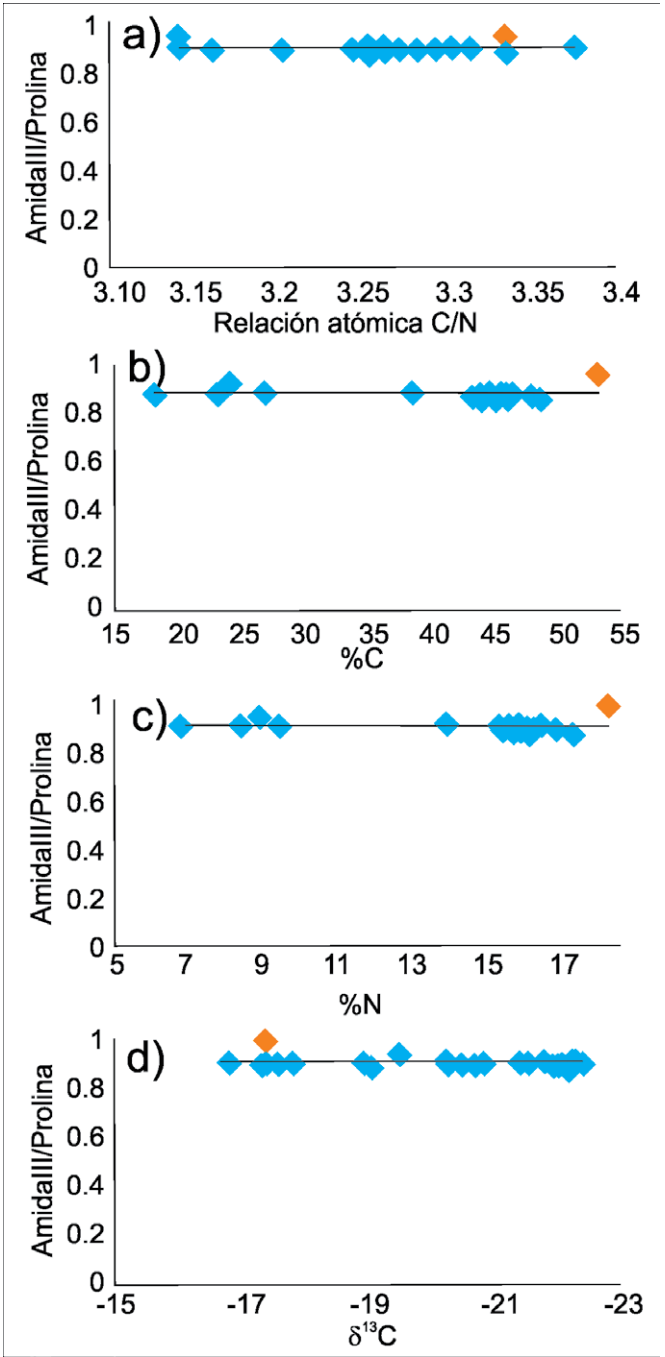


Figura 4: ReT% Amida III/Prolina para colágenos de calidad óptima (con relación C/N en el rango recomendado por Van Klinken (1999)) respecto de otros parámetros de calidad reconocidos (relación C/N, %C, %N, $\delta^{13}\text{C}$).

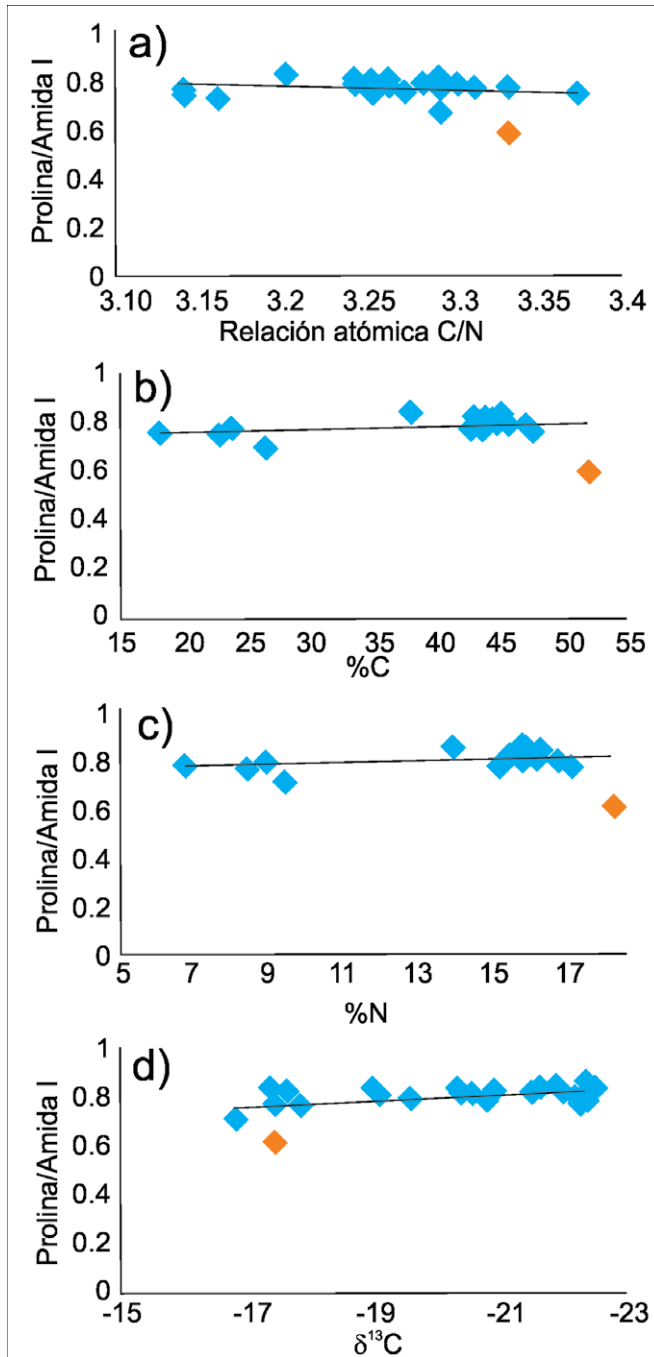


Figura 5: ReT% Prolina/Amida I para colágenos de calidad óptima (con relación C/N en el rango recomendado por Van Klinken (1999)) respecto de otros parámetros de calidad reconocidos (relación C/N, %C, %N, $\delta^{13}\text{C}$).

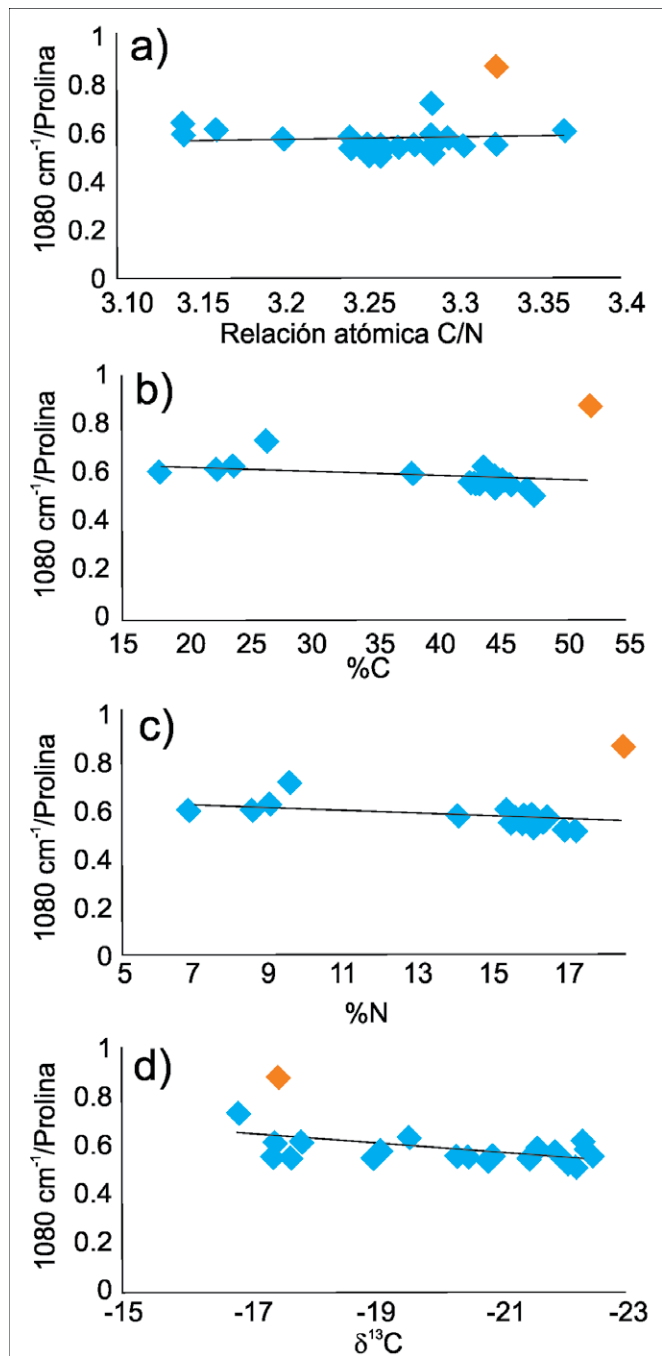


Figura 6: ReT% $1080\text{ cm}^{-1}/\text{Prolina}$ para colágenos de calidad óptima (con relación C/N en el rango recomendado por Van Klinken (1999)) respecto de otros parámetros de calidad reconocidos (relación C/N, %C, %N, $\delta^{13}\text{C}$).

Por último, la ReT% 1080 cm^{-1} /Prolina permite analizar la proporción entre el aminoácido mayoritario del colágeno y la formación de cadenas hidrocarbonadas producto de la descomposición de la proteína y la consecuente disminución del contenido de nitrógeno. Este parámetro, aunque presenta una variabilidad relativamente mayor a las demás ReT% (Tabla 2 y Figura 6), es el más representativo de la calidad del colágeno. En las Figuras 6a, b y d, se puede ver que no hay una tendencia con respecto a la relación C/N, al %C ni a la proporción $\delta^{13}\text{C}$. Sin embargo, respecto del contenido de nitrógeno (%N, Figura 6c) hay una clara tendencia a disminuir cuando este parámetro aumenta, aun en casos en los que la relación atómica de C/N está dentro del rango óptimo.

En la Figura 7 se muestra la comparación de las ReT% obtenidas de los espectros FTIR de:

- Colágenos con buena conservación, con relación C/N entre 3,1 y 3,5.
- Colágenos con mala conservación, con relación C/N mayor a 3,6.
- Colágenos anómalos, que tienen relación C/N = 2,9 o menor, los cuales dieron buenos rendimientos en la extracción, pero que tienen aporte de nitrógeno externo (del cual se sospecha contaminación). El caso particular de ese conjunto de muestras fue desarrollado en Politis *et al.* (2019 b). En esta clase también se incluye la muestra 3, que da buena relación C/N pero cuyo %C es muy alto.
- Colágenos con porcentaje de extracción mayor a 2, de los cuales no conocemos la relación C/N.
- Colágenos con porcentaje de extracción crítico (< 2%), de los cuales no conocemos la relación C/N.

Queda en evidencia en la Figura 7 que las ReT% establecidas adquieren diferentes valores para las categorías bien conservados, mal conservados y anómalos. También se observa que las muestras con % Colágeno > 2 no siempre clasificarían como buenos y en varios casos no obtendrían los valores esperables de las ReT% para calidad aceptable. A su vez, en algunas muestras con contenido crítico de colágeno sí se obtienen parámetros de calidad aceptables (es el caso específico de la muestra 6, ver Tabla 2). Se puede ver con claridad en las Figuras 7b, d, f y h que para la relación Amida III/Amida I los colágenos con rendimientos mayores a 2% dan valores iguales o menores a los establecidos como óptimos, mientras que para los colágenos con rendimiento crítico y malo pueden aparecer incluso valores mayores. En general, para todas las ReT% se observa que toman valores relativamente acotados para los colágenos con rendimientos de extracción mayores a 2% aun cuando no cumplen con la condición establecida para “colágenos buenos”, mientras que la dispersión de los datos es mayor en los de mala conservación y en los que dieron cantidades críticas, ya sea porque su rendimiento fue muy bajo y/o porque la relación C/N dio mayor a 3,6.

Se puede ver que al utilizar las ReT% es posible diferenciar en casi todos los casos las muestras con relaciones atómicas C/N entre 3,1 y 3,5 de aquellas con relaciones mayores a 3,6 o menores a 2,9% (justamente aquellas muestras marcadas en verde de las que se sospecha un aporte de nitrógeno orgánico externo). En todos los casos hay al

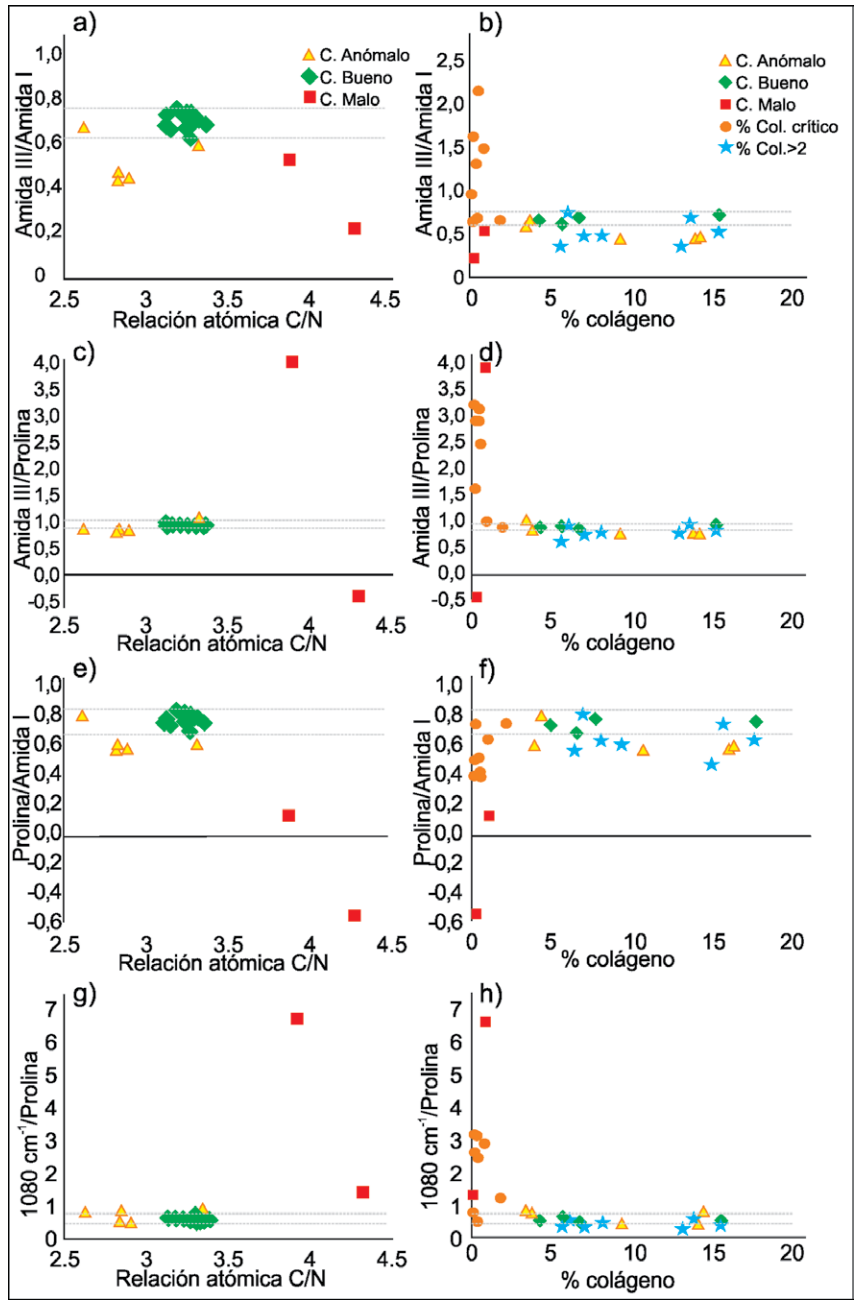


Figura 7: Distribución de datos en general en función de la relación C/N y el porcentaje de colágeno extraído. Clasificados como: "C. buenos", aquellos que tienen relación C/N entre 3.1 y 3.5; "C. malos", aquellos que tienen relación C/N > 3.6; "C. anómalos", los que tienen relación C/N < 2.9. Y para aquellos datos de los que no se conoce la relación C/N se presentan dos categorías en función del contenido de colágeno: % Colágeno > 2 y % Colágeno crítico

menos 2 de las 4 ReT% que no cumplen con las condiciones de calidad. Adicionalmente, para las muestras clasificadas como anómalas, como se desarrolló en un apartado anterior (muestras C5 y C6 de las Figuras 1 y 2), es posible identificar en el espectro FTIR de forma cualitativa otras bandas que no se corresponden con las del colágeno, las cuales explicarían este aporte de nitrógeno.

CONCLUSIONES

El análisis por FTIR permite determinar la calidad del colágeno extraído de piezas óseas y se puede asegurar que, cuando las relaciones de porcentajes de transmitancia para algunas bandas características dan valores en un rango óptimo, la calidad de conservación de las mismas es la adecuada. Como no es posible por medio de estas relaciones determinar en los colágenos que no cumplen con los valores establecidos si la causa es por contaminación o por degradación de la estructura proteica, se puede realizar una comparación cualitativa del espectro completo con el de un colágeno de buena calidad e identificar que todas las bandas vibracionales estén presentes y que no existan bandas adicionales que no sean características.

Esta técnica mediante el análisis sencillo y económico de una pequeña cantidad de colágeno permite estimar de forma relativamente certera si la calidad es la adecuada para realizar análisis isotópicos, especialmente dataciones radiocarbónicas, y seleccionar así las mejores muestras, sobre todo las de aquellos sitios en los que habitualmente no se tienen muestras adecuadas, como ha ocurrido recurrentemente en la región pampeana.

Esta herramienta también permite discutir los resultados obtenidos, lo que la transforma en una vía independiente para evaluar datos anómalos o *outliers*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires por el acceso al equipamiento y a los doctores Cristian Kaufman, Nahuel Scheifler, Luciana Stoessel, Gustavo Gómez y Pablo Messineo por el aporte de muestras óseas. Este artículo es producto del PUE-CONICET 2017-2021 “Ajuste cronológico de los procesos de continuidad y cambio en las sociedades indígenas del centro-este de argentina” y del PICT-2015-2777 de la ANPCYT. 2017-2020 “Un abordaje arqueológico de las poblaciones prehispánicas del sudeste de la región pampeana durante el Pleistoceno Final-Holoceno Medio”. P.V. es becaria posdoctoral de CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrose, S. H.
1990. Preparation and Characterization of Bone and Tooth Collagen for Isotopic Analysis. *Journal of Archaeological Science* 17: 431–451. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(90\)90007-R](https://doi.org/10.1016/0305-4403(90)90007-R)
- Belbachir, K., R. Noreen, G. Gouspillou, y C. Petibois.
2009. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395: 829–837. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3019-y>
- D'Elia, M., G. Gianfrate, G. Quarta, L. Giotta, G. Giancane y L. Calcagnile
2007. Evaluation of possible contamination sources in the ^{14}C analysis of bone samples by FTIR spectroscopy. *Radiocarbon* 49 (2): 201–210. <https://doi.org/10.1017/S0033822200042120>
- De Niro, M. J.
1985. Postmortem preservation and alteration of in vivo bone collagen isotope ratios in relation to paleodietary reconstruction. *Nature* 317: 806–809. <https://doi.org/10.1038/317806a0>
- Devièse T., T. W. Stafford, M. R. Waters, C. Wathen, D. Comeskey, L. Becerra-Valdivia y T. Higham
2018. Increasing accuracy for the radiocarbon dating of sites occupied by the first Americans. *Quaternary Science Reviews* 198: 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2018.08.023>
- Gianfrate, G., M. D'Elia, G. Quarta, L. Giotta, L. Valli y L. Calcagnile.
2007. Qualitative application based on IR spectroscopy for bone sample quality control in radiocarbon dating. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 259 (1): 316–319. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2007.01.309>
- Gutiérrez, M. A., G. Martínez, H. Luchsinger, S. Grill, A. F. Zucol, G. S. Hassan, M. P. Barros, C. A. Kaufmann y M. C. Álvarez
2011. Paleoenvironments in the Paso Otero locality during Late Pleistocene–Holocene (Pampean Region, Argentina): an interdisciplinary approach. *Quaternary International* 245 (1): 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2010.11.010>
- Lin-Vien, D., N. B. Colthup, W. G. Fateley y J. G. Grasselli.
1991. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press. San Diego.
- Longin, R.
1971. New Method of Collagen Extraction for Radiocarbon Dating. *Nature* 230: 241–242. <https://doi.org/10.1038/230241a0>
- Martínez, G.
2006. Arqueología del curso medio del río Quequén Grande: estado actual y aportes a la arqueología de la región pampeana. *Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología* 31: 249–275.

- Martínez, G. y M. A. Gutiérrez.
2011. Paso Otero 5: a summary of the interdisciplinary lines of evidence for reconstructing early human occupation and paleoenvironment in the Pampean region, Argentina. En Vialou, D. (ed.) *Peuplements et Préhistoire de l'Amérique*: 271-284. Muséum National d'Histoire Naturelle. Departement de Préhistoire, U.M.R. Paris.
- Metreveli, N. O., K. K. Jariashvili, L. O. Namicheishvili, D. V. Svintradze, E. N. Chikvaidze, A. Sionkowska y J. Skopinska.
2010. Ecotoxicology and Environmental Safety UV-vis and FT-IR spectra of ultraviolet irradiated collagen in the presence of antioxidant ascorbic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (3): 448-455. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.12.005>
- Politis, G. G. y J. Steele.
2014. Cronología radiocarbónica. En Politis, G., M. A. Gutiérrez y C. Scabuzzo (eds.) *Estado actual de las investigaciones en el sitio arqueológico Arroyo Seco 2 (pcia. de Buenos Aires, Argentina)*: 57-66. Serie Monográfica INCUAPA 5. Olavarría.
- Politis, G. G., P. G. Messineo, Th. W. Stafford Jr. y E. L. Lindsey.
2019 a. Campo Laborde: A late Pleistocene giant ground sloth kill and butchering site in the Pampas. *Science Advances* 5 (3): 4546. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau4546>
- Politis, G. G., D. C. León, F. Mari, A. Blasi y P. Vitale.
2019 b. Análisis y datación de los restos faunísticos de la colección Ameghino del sitio Cañada Rocha (pdo. de Luján, pcia. de Buenos Aires). *Intersecciones en Antropología* 20 (2): 181-194.
- Prockop, D. J. y N. A. Guzmán.
1981. El colágeno. *Tiempos Médicos* 191: 53-63.
- Riaz, T., R. Zeeshan, F. Zarif, K. Ilyas, S. Z. Safi, A. Rahim e I. Ur
2018. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy Reviews* 53 (9): 703-746. <https://doi.org/10.1080/005704928.2018.1426595>
- Rubinos Pérez, A.
2009. Límites de la geocronología en el estudio de yacimientos de época histórica. *Munibe (Antropología-Arkeología)* 60: 331-347.
- Stafford, T., K. Brendel y R. C. Duhamel.
1988. Radiocarbon, ¹³C and ¹⁵N analysis of fossil bone: Removal of humates with XAD-2 resin. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52: 2257-2267. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90128-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90128-7)
- Van Klinken, J. G.
1999. Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science* 26: 687-695. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0385>
- Vidal, B. D. C. y M. L. S. Mello.
2011. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron* 42 (3): 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.010>