

DATACIÓN POR ANÁLISIS DE RACEMIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS DE FÓSILES CUATERNARIOS. BASES Y APLICACIONES.

T. TORRES¹.

¹ Dpto. de Ingeniería Geológica. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas, Ríos Rosas 21, 28003 Madrid.

1.-INTRODUCCIÓN

En 1991 se firmó el Contrato entre la Empresa Nacional de Residuos Radiactivos S.A. (ENRESA) y la U.D. de Estratigrafía y Paleontología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas de Madrid (ETSIMM) n°0701041 " Datación de formaciones cuaternarias a partir de aminoácidos", que permitió que en pocos meses el laboratorio de AARD se convirtiera en operativo, el primero de España. Para su puesta a punto, se contó con la Dra. V. Meyer de la Universidad de Zurich (Suiza). Aunque trata de la primera instalación de este tipo en el país, la datación por análisis de la racemización de aminoácidos (AARD desde ahora) es un método conocido desde hace varias décadas; se podrían citar como antecesores remotos los trabajos de: Hare y Abelson (1968), Bada (1973) y como antecedentes metodológicos recientes, se pueden tomar los del Goodfriend (1987, 1988), Goodfriend y Meyer (1991), Wehmiller (1984, 1993).

2. BASES BIOLÓGICAS DEL MÉTODO.

Las proteínas, componentes esenciales de los organismos vivos, están formadas por aminoácidos (libres, péptidos y cadenas protéicas) y cada uno de ellos posee dos estereoisómeros: L-aminoácidos que desvían la luz polarizada hacia la izquierda y D-aminoácidos que lo hacen a la derecha. Todos los aminoácidos que forman las proteínas de los organismos vivos son L-aminoácidos y, tras su muerte, sufren un proceso de racemización, al convertirse en D-aminoácidos, finalizando al aparecer una mezcla 1/1 de ambos estereoisómeros (racémico). Como esta reacción depende del tiempo, y de la temperatura, los aminoácidos que persisten en los fósiles, se pueden usar como reloj geocronológico.

Aunque en las proteínas de los seres vivos se encuentra una gran variedad de aminoácidos, en AARD solo se identifican: alanina (ALA), valina (VAL), prolina (PRO), ale/ile-isoleucina (ISO), leucina (LEU), ácido aspártico (ASP), fenilalanina (FEN) y ácido glutámico (GLU). No siempre se preservan, identifican o dan resultados coherentes todos ellos.

El sistema AARD es uno entre los varios métodos de datación basados en diferentes aproximaciones, entre los que se incluyen: isótopos radiactivos, isótopos estables, resonancia de espín electrónico, trazas, termoluminiscencia, luminiscencia, paleomagnetismo, palinología, paleontología, etc. Si se lo compara con la datación mediante U/Th o ^{14}C (vía normal) está claro que se precisa de mucho menos muestra (80mg) y si se hace con la datación por ^{14}C con acelerador, los costos son varias veces menores. Por otra parte, el alcance del método sobrepasa el millón de años, mientras el ^{14}C llega a 50.000 años. Las series de isótopos radiactivos (U/Th) alcanzan unos 350.000 años.

El método AARD dió sus primeros pasos con la isoleucina, aminoácido que muchos laboratorios emplean aún, aunque tiene dos centros quirales que son origen de compuestos con misma fórmula y diferente comportamiento químico. Hoy día se analizan varios.

En una muestra, el grado de racemización (relación D/L) que presenta cada uno de los aminoácidos no es idéntico, ya que sus velocidades de racemización también lo son: el ácido aspártico se racemiza más rápidamente que los demás, y ello lo adecuó para datar materiales recientes; por el contrario el ácido glutámico racemiza muy lentamente y es el más útil para datar muestras antiguas.

3.-LA RACEMIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS COMO HERRAMIENTA GEOCRONOLÓGICA.

La racemización es una reacción química, y su desarrollo depende de la temperatura. Una concha de molusco de 100.000 años encontrada en una zona de latitud media, tiene una relación D/L de 0.4, aproximadamente, la misma concha en latitudes elevadas, daría un valor de 0.1 en la relación D/L. Por otra parte, la velocidad de racemización de un mismo aminoácido puede variar incluso entre géneros, lo que convierte al método en un refinado sistema de sistemática biológica, cuando se analiza la cinética de racemización de animales actuales, induciéndola térmicamente. Estos datos parecerían abonar la impresión de que el método es inadecuado para realizar dataciones absolutas, incluso en los casos en los que la cinética sea perfectamente conocida, debido a que la temperatura a que ha sido sometido el fósil no es conocida con suficiente precisión, sobre todo en largos períodos de tiempo. Dado que la relación entre la racemización y la temperatura no es lineal, se trata de una cinética parabólica, y no se conoce la media de la temperatura ambiental, se usa la llamada "temperatura diagenética efectiva", que es aquella a la que tendría que haber estado sometida la muestra para alcanzar el grado de racemización correspondiente a su edad.

Con todo esto, en principio solo se podría emplear el análisis de la racemización de aminoácidos como un sistema de datación relativa, distinguiendo aminozonas diferentes, o la

temperatura diagenética efectiva del lugar donde se ha tomado la muestra, siempre que se conozca su edad a través de otro método de datación. Obviamente, si se puede obtener una datación independiente, "calado del método", será posible realizar dataciones absolutas en una región con homogeneidad en su historia térmica. En la Fig.-1 aparece la datación de las terrazas travertínicas de Priego, Torres et. al (1994); las edades de las terrazas mas recientes (PR6 y PR12) se obtuvieron por el método del U/Th, y la AARD permitió situar la terraza más alta en el Cromer (PR4). Para mas detalles se refiere a Bada y Protsch (1973), Wehmiller y Hare (1971), Bada y Schroeder (1972), Masters y Bada (1977).

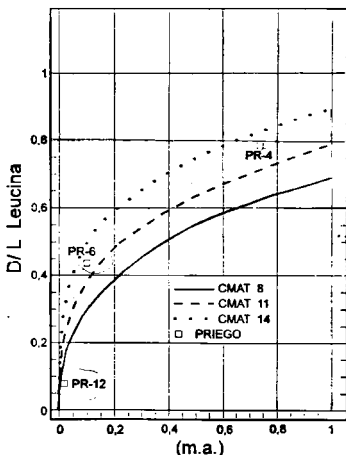


Fig.1. Curva de edad-racemización de leucina en gasterópodos de Priego, Torres et al. (op. cit.)

4.-EL MÉTODO.

4.1 Toma de muestras.

Las muestras deben ser representativas del nivel o estrato que se quiere datar, los depósitos deberán estar lo menos alterados posible; no expuestos a la intemperie, como en

antiguos desmontes de carretera o zonas con peligro de contaminación (vecindad de vertederos, corrales para el ganado, etc). Si esto no es posible, será necesario profundizar notablemente. Las muestras han de ser recogidas con guantes o pinzas, para evitar el contacto con el sudor de las manos. El traslado y conservación de las muestras sigue las pautas de un desmuestre normal en geología.

4.2. Preparación de muestras.

4.2.1. Preparación física

El objetivo de esta fase del proceso será conseguir que el material que se va a analizar esté perfectamente separado del sedimento que lo contenía, y que no existan elementos que puedan contaminar la muestra variando las relaciones D/L de los aminoácidos (colonias de microorganismos, algas, materia orgánica y posterior al depósito, etc).

Para ello se las somete a cepillado, tratamiento de ultrasonidos, lavado con agua corriente, H_2O_2 , agua ultrapura, y por último se sumergen varios segundos en HCl diluido, tras lo cual se vuelven a limpiar con agua ultralimpia, se secan en un evaporador y se trituran al tamaño adecuado para su correcto tratamiento, guardándose protegidos de la luz para evitar el crecimiento de organismos que las contaminarían.

4.2.2. Preparación química

Esta fase, larga y laboriosa, no especialmente complicada, requiere dos procesos distintos: extracción de los aminoácidos de los restos fósiles (hidrólisis), su conversión posterior en compuestos volátiles para que pasen a través del detector (derivatización).

La hidrólisis consiste en tomar una cantidad adecuada de muestra (80mg permiten realizar varios análisis), someterla a la acción de HCl en atmósfera inerte y temperatura elevada (100°). Con este proceso se liberan los aminoácidos rompiéndose cadenas protéicas.

La derivatización se hace para obtener compuestos volátiles que puedan ser analizados mediante la cromatografía de gases. En el laboratorio de la ETSIMM se sigue el proceso descrito por Goodfriend (1991), según el cual los aminoácido se convierten en ésteres N-trifluor acetil isopropílicos.

5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El proceso analítico utilizado es la cromatografía de gases; con ella se obtienen datos cuantitativos de la cantidad de cada uno de los aminoácidos (D y L) presentes en las muestras, pudiéndose obtener así los grados de racemización (D/L en %) cuyo conocimiento es base para el cálculo de la edad de las muestras y los sedimentos que las contienen.

Los resultados se presentan en forma numérica y gráfica, a través de los cromatogramas. Cada análisis individual se utiliza para hallar la edad del individuo que se quiere analizar y constituye un elemento del tratamiento estadístico general que se debe realizar.

La cromatografía es una técnica en la que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye en lecho estacionario de gran desarrollo superficial y la otra es un fluido que pasa a través y a lo largo del lecho estacionario. La separación de los componentes de una mezcla se basa en su reparto entre dos fases: fase móvil, fluido que se usa como portador de la mezcla, y fase estacionaria cuya misión es la de retener diferencialmente los distintos componentes de la mezcla a resolver, en base a procesos de adsorción o de absorción.

En el laboratorio de AARD de la ETSIMM, se emplea un cromatógrafo HP 5890AII donde el He actúa como gas portador de la mezcla y la fase estacionaria es una columna quiral (Chirasil Val-L de la casa Chrompack) de 25m de longitud.

6. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

A partir de unas condiciones instrumentales predefinidas, el tiempo de retención de una sustancia dada es característico pero no es específico, es decir: la señal obtenida puede corresponder a más de un tipo de sustancia. Para resolver este problema, en el laboratorio AARD se han preparado, y analizado, patrones artificiales de cada pareja D/L de aminoácidos. Se han determinado sus tiempos de retención; posteriormente se ha "construido" y analizado un patrón artificial con todos juntos, Fig. 2. También se ha contado con análisis de muestras standard de una ejercido de calibración interlaboratorios, cf. Wehmiller (op. cit.).

Aunque no tiene aplicación directa en el cálculo de edades, sí es importante poseer una información cuantitativa sobre la cantidad de aminoácidos presentes en las muestras. Para ello, será preciso que la respuesta del detector sea lineal con la concentración, en cuyo caso, la cantidad de cada componente en la muestra será proporcional al área de su pico cromatográfico, que será medida automáticamente por el integrador (HP-3396B) que, además, dibuja el cromatograma correspondiente a cada análisis. Para obtener correspondencia en valores relativos, se debe mezclar con la muestra a analizar un patrón, que puede ser interno (se añade a la muestra) o externo (se analiza por separado). En el laboratorio AARD de la ETSIMM se usan ambos sistemas, aunque rutinariamente se trabaja con patrón externo.

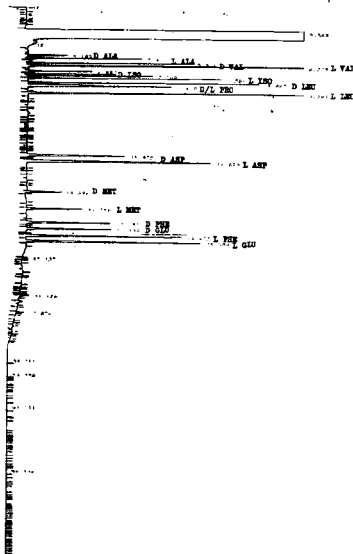


Fig. 2 Patrón artificial de aminoácidos.

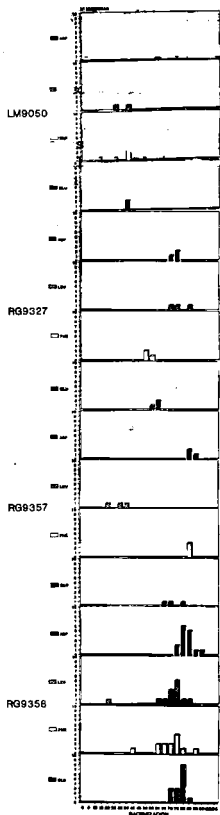
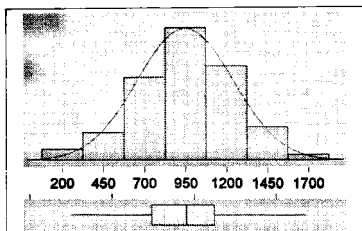


Fig. 3 Aminoestratigrafía de muestras de Cerastoderma de Cúllar-Baza (Granada)

Descriptive Statistics for: VM (Asp. + Pro. + Leu. + Phe. + Glu.)

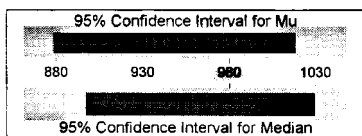


Anderson-Darling Normality Test

A-Squared: 0.2
p-value: 0.8

Mean: 948.5
Std Dev: 292.5
Variance: 85565.9
Skewness: -0.0
Kurtosis: 0.0
n of data: 70.0

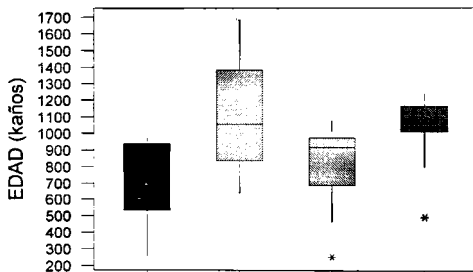
Minimum: 253.4
1st Quartile: 741.4
Median: 953.0
3rd Quartile: 1122.2
Maximum: 1684.2



95% Confidence Interval for Mu
878.7 1018.2

95% Confidence Interval for Sigma
250.8 351.0

95% Confidence Interval for Median
897.4 1029.6



	ASPAR.	LEUC.	PHEN.	GLUT.		
Variable	N	Mean	Median	TrMean	StDev	SEMean
ASPAR.	14	721.9	734.3	739.3	234.6	62.7
PROL.	0	*	*	*	*	*
LEUC.	14	1118.8	1055.8	1111.9	326.7	87.3
PHEN.	14	824.9	915.6	851.0	237.6	63.5
GLUT.	14	1040.0	1085.1	1068.7	194.5	52.0
TOTAL	70	948.5	953.0	947.4	292.5	35.0

Variable	Min	Max	Q1	Q3
ASPAR.	255.8	978.3	530.4	939.3
PROL.	*	*	*	*
LEUC.	637.0	1684.2	836.5	1382.7
PHEN.	253.4	1083.1	687.6	974.8
GLUT.	491.6	1244.0	1012.7	1165.5
TOTAL	253.4	1684.2	741.4	1122.2

Fig. 4. Aplicación del programa AARv1.0 para el cálculo de la edad numérica de muestras de Venta Micena (Granada)

7.-PRECISIÓN DEL MÉTODO

La precisión en la determinación de las relaciones D/L en el laboratorio, puede realizarse hasta con 5% de error, aunque lo más común es el 10%. Las edades estimadas, a partir de los valores D/L poseen una incertidumbre mayor que el error analítico (10%), pudiendo llegar al 25% para relaciones D/L >0,45.

Como regla general, la resolución de la datación AAR se puede considerar como del 20-25% de la edad estimada.

8.-MATERIALES SUSCEPTIBLES DE DATACIÓN.

Se obtienen resultados excelentes con moluscos marinos y continentales, aunque se han de analizar ejemplares que no hayan sufrido efecto calor (cocina), que produce la racemización total. También funciona bien con crustáceos (ostrácodos) y foraminíferos. Parece que el bajo contenido proteico de los restos de estos animales favorece la determinación. Sobre dientes y huesos el método funciona, y de hecho hay una amplia bibliografía sobre el tema, pero su complejidad bioquímica de origen, produce efectos indeseables a la hora del análisis.

Otros materiales de los que se está desarrollando un protocolo de análisis son los sedimentos, restos vegetales, espeleotemas etc. Estos últimos preservan cantidades notables de ácido aspártico, aunque su cinética no está definida.

9. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

De cada muestra analizada se obtiene un registro gráfico con los picos correspondientes a cada sustancia (aminoácido D y L aminoácido), también hay un registro numérico del área de cada pico, que es proporcional a la cantidad de sustancia en la muestra. Se dispone de un ordenador conectado al sistema con un programa específico de gestión (PEAK 94) que permite el archivo y reanálisis de todos los datos.

La interpretación de cada cromatograma consiste en identificar a que aminoácido corresponde cada pico, para poder conocer su área, y en definitiva, la relación de los valores D/L de las áreas de cada aminoácido. Si no se va a trabajar en química orgánica, no interesa conocer la cantidad de cada enantiómero en la muestra sino su relación, por lo tanto, es suficiente contar con el valor de las áreas, ya que éstas son proporcionales a la cantidad presente en la muestra.

Dado que cada aminoácido se racemiza con distinta velocidad, no se puede estimar la edad de la muestra usando solamente uno de ellos, sino que se aproxima un intervalo

temporal dentro del cual se define la edad, utilizando el conjunto de aminoácidos con resultados más claros a la hora de interpretar los cromatogramas (ac. aspártico-ASP, ac. glutámico-GLU, fenilalanina-FEN, leucina-LEU, prolina-PRO, alanina-ALA, valina-VAL.. etc.).

Así, una muestra en la que la relación de racemización sea alta en todos los aminoácidos, será más antigua que otra en la que dicha relación sea menor.

Para cada aminoácido existe una relación exponencial entre el valor D/L y la edad de la muestra (es una función ajustada a la raíz cuadrada del tiempo), en ella intervienen otros factores como la temperatura diagenética eficaz. Así se han podido llegar a representar curvas como la de la Fig.-1, donde se observa la edad aproximada de las muestras en función de los valores D/L leucina, obteniendo una curva diferente para cada valor. Con ella se ha estimado la temperatura diagenética eficaz (CMAT) a la que han estado sometidas las muestras de Priego: PR12, PR6 y PR4, trazando la curva correspondiente que pasa por ellas, dicha temperatura estaría situada entre los 11 y los 14 °C.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cada muestra se divide en submuestras que se someten al proceso completo (preparación física y química, análisis y datación propiamente dicha). Cada una se trata de forma aislada, para poder así disminuir los errores y llegar a resultados estadísticamente comprobados, que se evalúan considerando el conjunto total de muestras analizadas o agrupando las submuestras pertenecientes a la misma muestra.

La representación en forma de histograma para cada aminoácido de los valores de la relación D/L, constituye la **Aminoestratigrafía** y permite visualizar la edad relativa de las muestras. En la Fig. 3 se ha representado la aminoestratigrafía a partir de muestras de *Cerastoderma* sp., un pelecípodo de agua dulce, de la Depresión de Cúllar Baza.

Para los cálculos de edad numérica, **Aminocronología**, se aplica el programa propio AARv1.0, que permite no sólo la gestión de la base de datos analíticos, sino también el cálculo de edades y su tratamiento estadístico.

Los cálculos se realizan para los distintos aminoácidos y según el mejor ajuste a varios modelos cinéticos que se manejan. En la Fig.-4 aparecen los cálculos estadísticos de las muestras de Venta Micena, Torres et al. (1995) y en la Fig.-5 se recoge al análisis cluster de las muestras de Covaciella (Asturias), que revela la presencia de "dos generaciones" de edad.

11. LA PRESERVACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS.

Una de las cuestiones que se plantean inicialmente es la factibilidad de la preservación de los aminoácidos: de acuerdo con experimentos realizados en el laboratorio AARD de la ETSIMM, aunque la infiltración consigue arrastrar aminoácidos, se mantiene la relación racémica. En el transcurso del tiempo geológico este arrastre se traducirá en una pérdida progresiva de materia orgánica (y aminoácidos), pero generalmente siempre queda la cantidad como para poder ser analizada con el AARD. Posiblemente uno de los ejemplos mas espectaculares lo ofrecen los cromatogramas de la Fig.-6, donde se recogen los análisis de

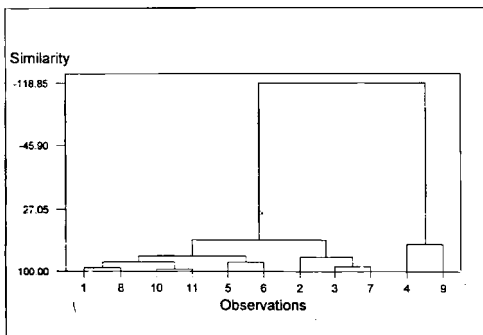


Fig. 5. Análisis de similitud de resultados de datación de las muestras del Holoceno de Covaciella (Asturias).

dos muestras: una (Covaciella), procedente de unos gasterópodos preservados en condiciones óxicas, adheridos a una colada estalagmítica y sometidos a la acción de aguas meteóricas. El otro (Golca) procede de un sondeo marino del Golfo de Cádiz, la cantidad de aminoácidos de las muestras, preservadas en medio reductor, anóxico y a baja temperatura es mas alta.

12. ALGUNOS RESULTADOS PROPIOS.

El laboratorio de AARD de la ETSIMM lleva funcionando un año y medio, y en este lapso de tiempo ha realizado una serie de trabajos de datación entre los que cabría citar los siguientes:

Aminozonación y aminocronología de la cuenca de Cúllar-Baza.
Fig.7.

 Datación de los niveles travertínicos de Priego y de Río Blanco, Torres et al. (1994, 1995).

 Datación de los abanicos aluviales de Redueña, Llamas et al. (1995).

 Datación de episodio neotectónico de Huete (Inédito).

 Se está trabajando con buenos resultados en dientes de mamíferos del Holoceno, al trabajar con material del Pleistoceno han aparecido algunos problemas que están en vía de resolución.

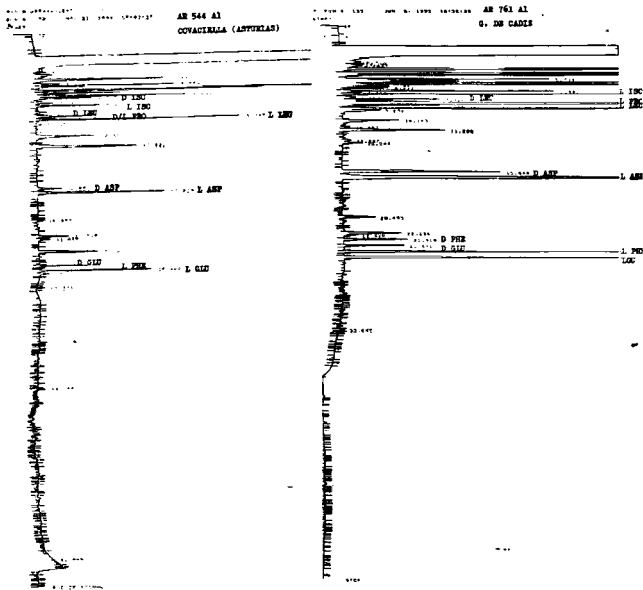
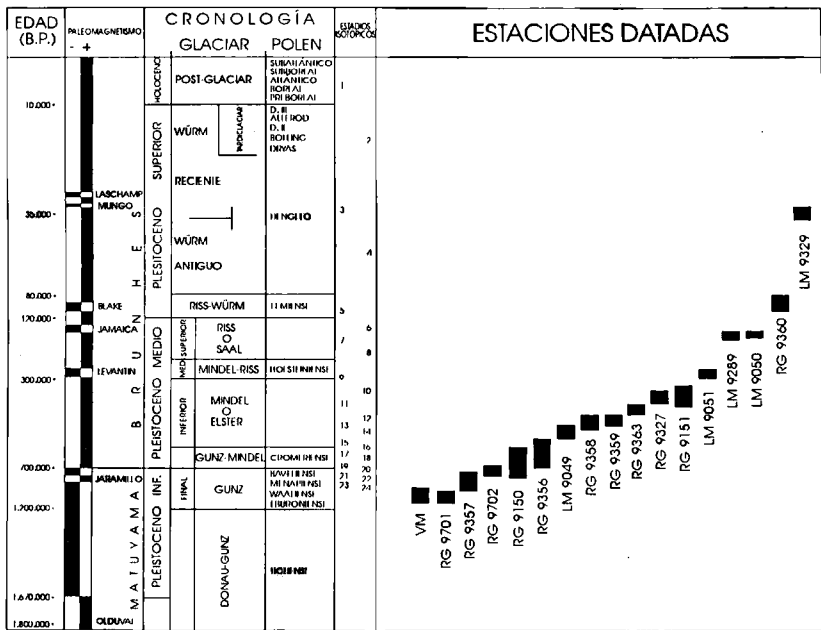


Fig. 6 Cromatogramas de Helicacea de Covaciella (Asturias)-A y de Tellina sp. de un sondeo del G. de Cádiz. Holoceno.

Fig. 7. Amiocronología de estaciones muestreadas en la cuenca de Cullar Baza (Granada)



13. BIBLIOGRAFÍA

Bada, J.L., Schroeder, R.A. 1972: Racemization of isoleucine in calcareous marine sediments: kinetics and mechanism. Earth Planet Sci. Lett. 15: 1-11.

Bada, J.L., Protsch, R., Schroeder, R.A. 1973: The racemization reaction of isoleucine used as paleotemperature indicator. Nature, 241: 394.

Bada, J.L., Kvenvolden, K.A., Peterson, E. 1973: Racemization of amino acids in bones. Nature, vol. 245: 308-310.

Goodfriend, G.A. 1987: Chronostratigraphic studies of sediments in the Negev Desert using amino acid epimerization analysis of land snail shells. Quat. Research, 28: 374.

Goodfriend, G.A., Mitterer, R.M. 1988: Late Quaternary land snails from the north coast of Jamaica: Local extinctions and climatic change. Palaeog., Palaeoclimatol. Palaeoecol., 63: 1319.

Goodfriend, G.A., Meyer, V.R. 1991: A comparative study of the kinetics of amino acid racemization/epimerization in fossil and modern mollusk shells. Geochim. Cosmochim. Acta, 55: 3355-3367.

Hare, P.E. 1969: Geochemistry of proteins, peptides, and amino acids. G. Eglinton, and M.T.J. Murphy, Eds. Organic Geochem., pp. 438-463, Berlin: Springer-Verlag.

Hare, P.E., Albeson, P.H. 1968: Racemization of amino acids in fossil shells. Carnegie Inst. Washington Yearb., 66: 526-528.

Llamas, T., Torres, T.J., Canoira, L., García-Alonso, P., García-Cortés, A., Hoyos, Mansilla, H., Meyer, V.R., Nodal, T. 1995: Aminocronología de los depósitos del Pleistoceno medio de Redueña, Madrid. Geogaceta, 17: 43-45.

Masters, P.M., Bada, J.L. 1997: Racemization of isoleucine and fossil mollusks from Indian middens and interglacial terraces in Southern California. Earth Planet Sci. Lett. 37: 173-183.

Meyer, V.R. 1992: Amino acid racemization: a tool for fossil dating. Chemtech, July: 412-417.

Torres, T.J., Canoira, L.T., Cobo, R., García-Alonso, P., García-Cortés, A., Juliá, R., Llamas, J., Meyer, V.R. 1994: Aminocronología y aminozonación de los travertinos fluviales de Priego (Cuenca, España Central). Geogaceta, 17:

Torres, T.J., Canoira, L.T., Cobo, R., García-Alonso, P., García-Cortés, A., Juliá, R., Llamas, J., Meyer, V.R. 1994: Pleistocene carbonate deposits of Central Spain: Paleoenvironmental Relationships. Geoprospective, Paris abr. 1994. (in litt.)

Torres, T.J., Canoira, L.T., García-Alonso, P., García-Cortés, Mansilla, H. 1995: Amino Chronology of the Lower Pleistocene deposits of Venta Micena (Orce, Granada, Andalusie, Spain). 17th Int. Meeting of Organic Geochemistry, Donostia (Spain). (Accepted).

Torres, T.J., Canoira, L., Cobo, R., Coello, F.J., García-Alonso, P., García-Cortés, A., Hoyos, M., Llamas, J., Soler, V., Valle, M. 1995: Travertinos de Río Blanco (Soria): Edad y evolución. Geogaceta, 18 (in litt).

Wehmiller, J.F., Hare, P.E. 1971: Racemization of amino acids in marine sediments. Science, 173: 907-911.

Wehmiller, J.F., Belknap, D.F. 1982: Amino acid age estimates, Quaternary Atlantic Coastal Plain: Comparison with U-series dates, Biostratigraphy, and Paleomagnetic Control. Quat. Res., 18: 311-336.

Wehmiller, J.F., York, L.L., Belknap, D.F., Snyder, S.W. 1992: Theoretical correlations and lateral discontinuities in the Quaternary aminostratigraphic record of the U.S. Atlantic Coastal Plains. Quat. Res., 38: 275-291.

Wehmiller, J.F. 1984: Interlaboratory comparison of amino acid enantiomeric ratios in fossil Pleistocene mollusk. Quat. Res., 22: 109-120.

Wehmiller, J.F. 1993: Applications of organic Geochemistry of Quaternary Research. Aminostratigraphy and amino chronology. Organic Geochem., chapter 36: 755-783.