

# Algoritmos de cálculo de edad del ostrácodo *Herpetocypris reptans* (Baird) a partir de ratios de racemización de aminoácidos.

*Numerical dating algorithms of the ostracode Herpetocypris reptans (Baird) from amino acid racemization ratios*

J.E. Ortiz <sup>(1)</sup>, T. Torres <sup>(1)</sup>, A. Delgado <sup>(2)</sup>, R. Julià <sup>(3)</sup>, L. Canoira <sup>(1)</sup>, M. A. García de la Morena <sup>(1)</sup>, F.J. Llamas <sup>(1)</sup> y M. Lucini <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratorio de Estratigrafía Biomolecular. E.T.S.I. Minas de Madrid. C/Ríos Rosas 21, 28003 Madrid. e-mail jeortiz@dinge.upm.es

<sup>(2)</sup> Estación Experimental El Zaidín (C.S.I.C.). C/ Prof. Albareda 1, Granada.

<sup>(3)</sup> Instituto Jaume Almera (C.S.I.C.). C/ Lluís Sole i Sabarís s/n. Barcelona.

## ABSTRACT

Age calculation algorithms for D/L ratios of four amino acids (alanine, aspartic acid, phenylalanine and glutamic acid) analysed in the continental ostracode species *Herpetocypris reptans* (Baird) were determined for southern and central Iberian Peninsula, where they are abundant, using the Mitterer and Kriausakul (1989)'s mathematical approach.

Using these algorithms, several beds will be able to be dated and, therefore, the Pleistocene paleoenvironmental events of different areas of Spain will be placed in a chronostratigraphical scale.

**Key words:** Amino acid racemization, age calculation, Pleistocene, ostracodes, Spain.

*Geogaceta*, 31 (2002), 185-188

ISSN:0213683X

## Introducción

En los últimos años se ha producido un gran desarrollo de los estudios de evolución paleoambiental con el objeto de caracterizar las variables del clima y los procesos ambientales. No obstante, uno de los aspectos más importantes relacionados con este tipo de estudios palaeoambientales y paleoclimáticos consiste en situar los eventos observados en una secuencia cronológica.

Por tanto, estas reconstrucciones necesitan ser soportadas por los diversos métodos de datación, como <sup>210</sup>Pb, <sup>14</sup>C o U/Th, dependiendo de la escala de tiempo. Entre ellos se encuentra el método de racemización de aminoácidos que puede ser aplicado a un gran número de materiales, entre los que se incluyen moluscos y ostrácodos. Este método es especialmente útil para rangos de edad comprendidos entre 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> años B.P., es decir, supera total y parcialmente los límites de los métodos de radiocarbono y U/Th respectivamente. Asimismo también se ha aplicado para datar muestras más recientes, del Holoceno o incluso del último siglo o década (Goodfriend *et al.*, 1991;

Goodfriend, 1992; Goodfriend *et al.*, 1992; Goodfriend *et al.*, 1995) y, más allá, en determinaciones forenses (Ohtani *et al.*, 1998).

Sin embargo el método de racemización de aminoácidos no es un método de datación absoluta en sí mismo y, por tanto, necesita ser calibrado empleando otros métodos de datación para poder establecer algoritmos de cálculo de edad que puedan usarse para datar muestras más antiguas. Además, la racemización es un proceso que depende de la temperatura y del género, por lo que los algoritmos sólo se pueden calcular a partir de muestras con el mismo tipo de fauna y recogidas en zonas que tengan la misma historia térmica.

Para llevar a cabo la calibración es necesario partir de numerosas muestras previamente datadas y de diferentes edades debido a que el proceso de racemización no se comporta de manera lineal. Cuando las muestras datadas no son abundantes, la calibración se puede ver simplificada considerando un comportamiento de "cinética reversible de primer orden" (Mitterer, 1975), aunque solamente cuando se tienen muestras con ratios D/L ba-



Fig. 1.- Situación geográfica de la turbera de Padul y Priego.

Fig. 1.- Geographical location of Padul Peat Bog and Priego area.

jos, debido a que la tasa o velocidad de racemización descende con el tiempo, produciendo una relación no lineal entre los ratios D/L y la edad (Goodfriend, 1991). En este caso el modelo de "cinética reversible de primer orden" se puede aplicar a muestras con ratios D/L de 0,3 (Masters y Bada, 1977; Kriausakul y Mitterer, 1980) ó 0.5 (Wehmiller y Hare, 1971; Bada y Schroeder, 1972) dependiendo del material empleado.

Otros autores (Mitterer y Kriausakul, 1989; Csapò *et al.*, 1998) emplean un ar-

tificio matemático que consiste en el establecimiento de una relación lineal entre la raíz cuadrada del tiempo y los ratios D/L. En este caso, incluso con solamente una muestra puede establecerse el modelo de cálculo de edad. Otros autores prefieren obtener esta relación lineal entre los ratios D/L y una función exponencial del tiempo (Kaufman, 2000).

De acuerdo con nuestra experiencia los ostrácodos presentan una serie de características que los hacen ser un excelente material para datar mediante el método de racemización de aminoácidos (Ortiz, *et al.*, 2000). Por un lado la alta cantidad de aminoácidos presentes en las valvas permite analizar una muestra menor (10-20 mg) en un cromatógrafo de gases (GC) comparado con el peso necesario de otros organismos (80 mg). Con un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), incluso una sola valva puede ser suficiente para realizar un análisis (*cf.* Kaufman, 2000). No obstante hay que considerar que para un análisis por cromatografía de gases se emplean muestras que contienen entre 1500 y 2000 valvas, con lo que el error debido a la muestra es muy bajo y los resultados son estadísticamente significativos y repetitivos.

Además, en algunos ambientes los ostrácodos son muy abundantes y, en ocasiones constituyen los únicos restos presentes en los niveles demuestrados o en sondeos.

En el Laboratorio de Estratigrafía Biomolecular se está estudiando la evolución paleoambiental durante el Pleistoceno de diferentes áreas de España. Entre ellas se encuentran la turbera de Padul (Granada) y las terrazas travertínicas de Priego (Cuenca), donde en ambas el ostrácodo *Herpetocypris reptans* (Baird) es abundante. Además, algunos niveles que contenían individuos de esta especie, fueron datados con métodos de datación absoluta como el  $^{14}\text{C}$  y U/Th y, por consiguiente, se pueden establecer los algoritmos de cálculo de edad del ostrácodo *Herpetocypris reptans* a partir de ratios de racemización de aminoácidos. La utilización conjunta de muestras procedentes de la turbera de Padul y de Priego se hace posible ya que ambas posiblemente tuvieran una historia térmica similar, con una temperatura anual media (CMAT) comprendida entre  $11^\circ$  y  $14^\circ\text{C}$  (*cf.* Torres *et al.*, 1994, 1997).

#### Áreas de estudio

La turbera de Padul (fig.1) se encuentra a 20 km al sur de Granada. Se trata de una cuenca endorreica de 4 km<sup>2</sup> rodeada

Muestra	Edad (ka)	D/L Ala	D/L Asp	D/L Phe	D/L Glu	Análisis
Actual	0	-	$0.041 \pm 0.002$	-	$0.017 \pm 0.003$	24
SPD-0136	6	$0.075 \pm 0.002$	$0.182 \pm 0.000$	$0.086 \pm 0.032$	$0.056 \pm 0.001$	2
PR-6	$105,132 \pm 7,648$	-	0.333	0.251	0.117	1
PR-7	$156,005 \pm 7,970$	$0.272 \pm 0.003$	$0.375 \pm 0.001$	$0.276 \pm 0.037$	$0.122 \pm 0.008$	2
SPD-3160	$167,321 \pm 17,659$	$0.252 \pm 0.019$	$0.401 \pm 0.010$	$0.306 \pm 0.000$	$0.140 \pm 0.005$	2

Tabla I.- Muestras empleadas en la calibración. Los valores de la muestra actual proceden de Kaufman (2000).

Table I.- Samples employed in the calibration. Actual ostracode racemization ratios were obtained by Kaufman (2000).

por cadenas montañosas, situada a 720 metros s.n.m. Presenta uno de los mejores registros disponibles del Cuaternario de más de 100 metros de potencia. En 1997 se perforó un sondeo de 103 metros (ver Nestares y Torres, 1998, para una descripción detallada) con el objeto de estudiar el polen, los isótopos estables y los biomarcadores en los sedimentos.

Las terrazas fluviales de Priego (Cuenca) se sitúan en las estribaciones de la Cordillera Ibérica (fig.1), donde tres ríos (Escabas, Trabaque y Guadiela) confluyen cerca de esta localidad después de transcurrir a través de estrechos cañones, depositando un extenso sistema de terrazas travertínicas durante el Pleistoceno. Siete niveles de terrazas fueron identificadas y descritas en Torres *et al.* (1994).

Para el cálculo de los algoritmos también se emplearon valores de ratios de racemización de ostrácodos actuales aportados por Kaufman (2000).

#### Material y método

En el cálculo de los algoritmos se han empleado siete muestras. Una de ellas corresponde a ostrácodos actuales que se analizaron para conocer la racemización inducida del método en la preparación de muestras. Dos de ellas, Priego-6 y Priego-7 (PR-6 y PR-7), se tomaron en terrazas travertínicas cercanas a Priego previamente datadas (Torres *et al.*, 1994). Las cuatro restantes se tomaron del testigo de sondeo de la turbera de Padul.

En el testigo de este sondeo (SPD), se seleccionaron muestras de turba de los niveles SPD-0198 y SPD-3160 (la numeración de las muestras corresponde con su profundidad en cm) para datarlos mediante los métodos de radiocarbono y U/Th respectivamente. Desafortunadamente la muestra SPD-0198 era estéril en ostrácodos por lo que se buscaron en la muestra cercana, en concreto la SPD-

0136. La muestra SPD-3160 contenía valvas de ostrácodos. Por último, se empleó una muestra correlacionable con un nivel datado por Pons y Reille (1988) que corresponde con el nivel SPD-0010.

#### Datación por U/Th

Para la datación mediante el método de U/Th de la muestra SPD-3160 se seleccionaron y prepararon muestras de turba de acuerdo con el protocolo de Vogel y Kronfeld (1980). Las muestras se analizaron, al igual que las de Priego, en el Instituto Jaume Almera (C.S.I.C., Barcelona) por uno de los coautores (R.J.).

#### Datación por $^{14}\text{C}$

La datación de la muestra turba SPD-0198 mediante el método del  $^{14}\text{C}$  se realizó en el Instituto Rocasolano de Madrid (C.S.I.C.). Se tomó una muestra de 100 mg. La edad fue calibrada mediante el programa de la Universidad de Washington, método B, 2 sigma.

#### Datación por racemización de aminoácidos

A pesar de la dificultad genérica que presenta el poder encontrar restos de organismos con caparazón carbonatado en las turberas debido a que la acidez del medio produce la disolución del carbonato cálcico, en algunos niveles del testigo del sondeo de Padul se pudieron recoger fósiles para datar mediante el método de racemización de aminoácidos.

Tanto las muestras del sondeo de Padul como de las terrazas fluviales de Priego están constituidas únicamente por ostrácodos de la especie *Herpetocypris reptans* (Baird).

Los ostrácodos se limpiaron con la ayuda de un baño de ultrasonidos y se seleccionaron entre 15 y 20 mg (*ca.* 4000 valvas) empleando una lupa binocular Wild. Las muestras fueron preparadas y

analizadas en el Laboratorio de Estratigrafía Biomolecular de la E.T.S.I. Minas de Madrid de acuerdo con el protocolo y método de Goodfriend (1991) y Goodfriend and Meyer (1991) que, de forma resumida, consiste en: 1) hidrólisis, 2) primera etapa de derivatización con cloruro de tionilo e isopropanol, y 3) segunda etapa de derivatización con anhídrido trifluoroacético y diclorometano.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 A (II) con inyector automático HP 6850, columna Chirasil L-Val de 25 m de longitud y detector NPD. El análisis de los picos se llevó a cabo en el programa PEAK 96 (HP).

## Resultados y discusión

Los resultados de las dataciones de  $U/Th$  y  $^{14}C$  junto con los ratios D/L de distintos aminoácidos de las muestras empleadas en la calibración se encuentran en la tabla I.

Las muestras Priego-6 and Priego-7 (PR-6 and PR-7) son travertinos que fueron datadas en  $105,132 \pm 7,648$  ka and  $156,005 \pm 7,970$  ka respectivamente (Torres *et al.*, 1994). La muestra SPD-3160 del sondeo de Padul fue datada en  $167,321 \pm 17,659$  ka.

Para el cálculo por interpolación de la edad de la muestra de ostrácodos SPD-0136 (situada a una profundidad de 136 cm) se emplearon dos muestras de turba datadas mediante  $^{14}C$ . Una de ellas estaba situada 62 cm por debajo (muestra SPD-0198, edad:  $6,782 \pm 0,120$  ka) mientras que la otra estaba 180 cm por encima de la muestra con ostrácodos (SPD-0010), datada en  $4,450 \pm 0,060$  ka (Pons y Reille, 1988). La edad resultante para la muestra SPD-0136 fue de ca. 6 ka.

Asimismo se emplearon los valores de los ratios D/L del ácido aspártico y glutámico analizados en valvas actuales de *Candona sigmoides* Sharpe y *Candona subacuminata* (Fischer) aportados por Kaufman (2000).

Únicamente se emplearon en la calibración de los modelos de cálculo de edad las relaciones D/L de la alanina, ácido aspártico, fenilalanina y ácido glutámico (Tabla I) debido a que los ratios D/L de otros aminoácidos (isoleucina, valina y leucina) daban cierta dispersión de valores. Esto se corresponde con los datos aportados por Torres *et al.* (2000) según los cuales, los aminoácidos más fiables para datar muestras antiguas son la isoleucina y la leucina, mientras que para muestras más

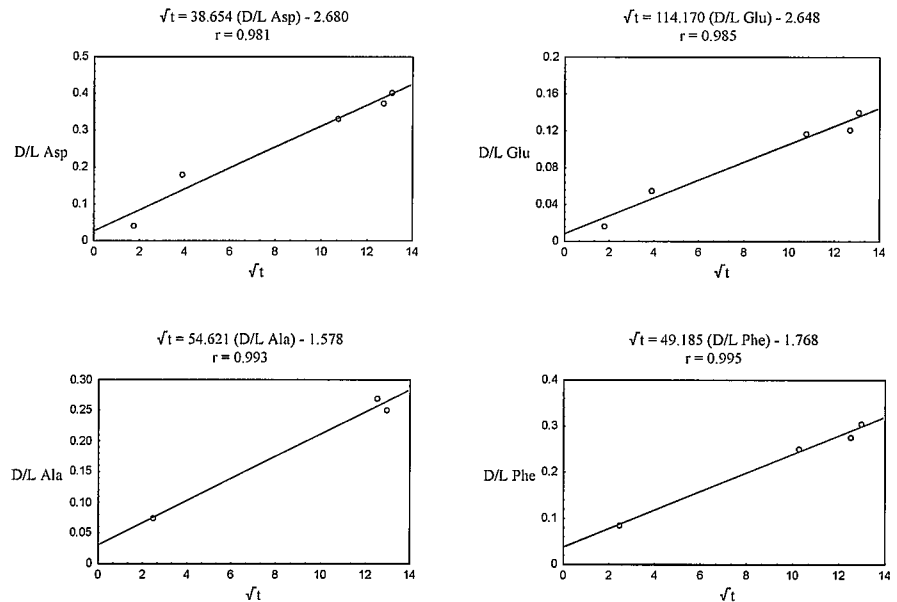


Fig. 2.- Algoritmos de cálculo de edad de la alanina, ácido aspártico, fenilalanina y ácido glutámico del ostrácodo *Herpetocypris reptans* (Baird).

Fig. 2.- Age calculation algorithms of alanine, aspartic acid, phenylalanine and glutamic acid of the ostracode *Herpetocypris reptans* (Baird).

jóvenes, como las de este trabajo, se deben emplear otros aminoácidos, principalmente el ácido aspártico ya que es el que tiene una velocidad de racemización más alta.

Los algoritmos de cálculo de edad se definieron empleando la aproximación matemática propuesta por Mitterer y Kriausakul (1989) que relaciona la raíz cuadrada del tiempo con el ratio de racemización de cada aminoácido.

Se realizó el análisis de regresión de los ratios D/L de la alanina, ácido aspártico, fenilalanina y ácido glutámico con la raíz cuadrada del tiempo, resultando:

$$\sqrt{t} = 4,621 D/L \text{ Ala} - 1,578 \quad R = 0,993; p = 0,076$$

$$\sqrt{t} = 38,654 D/L \text{ Asp} - 2,680 \quad R = 0,981; p = 0,003$$

$$\sqrt{t} = 49,185 D/L \text{ Phe} - 1,768 \quad R = 0,995; p = 0,005$$

$$\sqrt{t} = 114,170 D/L \text{ Glu} - 2,648 \quad R = 0,985; p = 0,002$$

Todas las regresiones son significativas ( $p < 0,05$ ), excepto para la alanina y con coeficientes de correlación muy altos.

## Conclusión

Se han obtenido los algoritmos de cálculo de edad para los ratios D/L de la alanina, ácido aspártico, fenilalanina y ácido glutámico analizados en ostrácodos de la especie *Herpetocypris reptans* (Baird) utilizando el artificio matemático propuesto por Mitterer y Kriausakul (1989). Con estas ecuaciones se podrán datar depósitos cuaternarios

de la zona central y sur de la Península Ibérica.

## Agradecimientos

El Laboratorio de Estratigrafía Biomolecular ha sido financiado por la Empresa Nacional de Residuos Radiactivos. El análisis de  $^{14}C$  se realizó en el Instituto Rocasolano de Madrid (C.S.I.C.). Los datos de los travertinos de Priego fueron estudiados en el Proyecto UE CEC-FI2W-CT91-0075. El sondeo de Padul se realizó como parte del proyecto EQUIP FI4W/CT96/0031.

## Referencias

- Bada J.L. y Schroeder, R.A. (1972): *Earth and Planet. Sci. Lett.* 15, 1-11.
- Csapó J, Csapó-Kiss Z y Csapó J Jr. (1998): *Trends in Analytical Chemistry* 17(3), 140-148
- Goodfriend, G.A. (1991): *Geochim. et Cosmochim. Acta* 55, 293-302.
- Goodfriend, G.A. y Meyer, V. (1991): *Geochim. et Cosmochim. Acta* 55, 3355-3367.
- Goodfriend, G.A. (1992): *Nature*, vol 357, 399-401.
- Goodfriend, G.A., Hare, P.E. y Druffel, E.R.M. (1992): *Geochim. et Cosmochim. Acta*, 56, 3847-3850.
- Goodfriend, G.A., Kashgarian, M. y Harasewych (1995). *Geochim. et Cosmochim. Acta*, 59 (6), 1125-1129.

- Goodfriend, G.A., Von Endt, D.W., Hare, P.E. (1991): *Ann. Rept. Director, Geophys. Lab., Carnegie Inst. Wash.*, 1990-1992, 172-176
- Kaufman, D. (2000): En Goodfriend, G.A., Collins, M.J., Fogel, M.L., Macko, S.A., Wehmiller, J.F. (Eds) *Perspectives in Amino Acids and Protein Geochemistry*. Oxford University Press, New York. 145-160.
- Kriassakul, N. y Mitterer, R.M. (1980): En Hare, P.E., Hoering, T.C. y King, K.Jr. (Eds) *Biogeochemistry of Amino Acids*. Wiley, 383-396
- Masters, P. y Bada J.L. (1977): *Earth Planet. Sci. Lett.*, 37, 173-183.
- Mitterer, R. (1975): *Earth and Planet. Sci. Lett.*, 28, 275-282.
- Mitterer, R.M. y Kriassakul, N. (1989): *Quaternary Sci. Rev.* 8, 353-357.
- Nestares, T., Torres, T. (1998): *Geogaceta* 23, 99-102
- Ohtani S., Kato, S., Sugeno, H., Sugimoto, H., Marumo T, Yamazaki M. y Yamamoto, K. (1998): *Bull. Kanagawa Dental Coll.* 9, 11-21.
- Ortiz, J.E. (2000): Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, 563 pp.
- Ortiz, J.E., Torres, T., Llamas, J.F., Canoira, L., García-Alonso, P., García de la Morena, M.A., Lucini, M. (2000): *Geogaceta* 28, 109-112.
- Pons, A. y Reille, M. (1988): *Paleoeco.*, *Paleoclim, Paleoecol.* 66, 243-263.
- Torres, T., Canoira, L., Cobo, R. García,P. García Cortés, A. Juliá, R. Llamas, J. Hoyos, M. Meyer, V. (1994): *Geogaceta* 17, 102-105.
- Torres T. Llamas J. Canoira L. García-Alonso P. García-Cortés A., Mansilla H. (1997): *Org. Geochem.* 26, 85-97.
- Torres, T, Llamas, J., Canoira, L., Coello, F.J., García-Alonso, P., Ortiz, J.E. (2000): En Goodfriend, G.A., Collins, M.J., Fogel, M.L., Macko, S.A., Wehmiller, J.F. (Eds) *Perspectives in Amino Acids and Protein Geochemistry*. Oxford University Press, New York. 263-278.
- Vogel, J.C. y Kronfeld, J. (1980): *South African Journal of Science* 76, 557-558.
- Wehmiller, J.F. y Hare, P.E. (1971): *Science* 173, 901-911.