

NOTA TÉCNICA



Técnicas de preparación de muestras sedimentarias para la extracción de fitolitos

Alejandro Fabián ZUCOL¹ y Margarita OSTERRIETH²

Introducción

Los fitolitos, para los fines de las técnicas de extracción, pertenecen al grupo de los microfósiles que resultan alterados por el tratamiento con ácidos fuertes. Si bien algunas de las técnicas utilizadas para su concentración son comunes con la metodología aplicada en microfósiles ácido resistentes, las principales diferencias radican en sustituir todo tratamiento con ácido fuertes, ajustar los valores densimétricos de separación y seleccionar correctamente las fracciones granométricas de la muestra de acuerdo al rango de tamaño de los fitolitos. Al efectuarse un ataque con un ácido fuerte (por ejemplo ácido fluorhídrico) se disolverá todo material silíceo, incluyendo los fitolitos. Si por otra parte se realiza una separación densimétrica ajustando el peso específico del líquido pesado a 2,0 (como comúnmente se realiza para paleopalinoología), se perderá una fracción de microfósiles (de peso específico entre 2,0 - 2,3) con los minerales pesados, la cual es cuali y cuantitativamente rica en fitolitos (Fredlund, 1986). Por último, si bien algunos autores mencionan que un elevado porcentaje de los fitolitos aislados no superan los 20 µm de diámetro (Wilding y Drees, 1971), existen numerosas formas diagnósticas de mayor tamaño, como así también fitolitos articulados en fragmentos de tejido silicificado de hasta 10 - 20 células. Esto hace necesario ajustar la metodología de extracción al amplio rango de tamaño de los fitolitos, en relación con las fracciones granométricas de las muestras.

Distintos métodos de extracción de fitolitos han sido propuestos de acuerdo a la naturaleza de las muestras (Bertoldi de Pomar, 1976; Fredlund, 1986; Kondo *et al.*, 1987; Piperno, 1988; Rovner, 1990; Pearsall, 2000). En la presente contribución se describe una metodología básica, que con pequeñas variantes puede ser aplicada a muestras de sitios arqueológicos, muestras de suelos y de sedimentos; y que ha sido implementada con éxito desde los sedimentos más recientes (holocenos), hasta sedimentos paleógenos (eocenos).

Metodología

La metodología comprende cinco conjuntos de tareas, que cronológicamente son las siguientes:

A) Preparación de la muestra

A.1) Secado. El secado de la muestra debe realizarse a temperatura moderada y en ambiente libre de contaminaciones,

¹Centro de Investigaciones Científicas-Diamante (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Materi y España SN, 3105 Diamante, Argentina. cidzucol@infoshopdte.com.ar

²Centro de Geología de Costas y Cuaternario, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Mar del Plata, CC 722 Correo Central, 7600 Mar del Plata, Argentina. mosterri@mdp.edu.ar

en estufa o secadero. Para ello, se distribuye la muestra en forma pareja sobre un recipiente de fondo plano y se lleva a estufa, removiendo el material periódicamente para facilitar el proceso. Si bien la temperatura y el tiempo de secado se encuentran condicionados por las propiedades del material y el tipo de investigación, se debe evitar sobrepasar los 60 °C para que no se produzcan terrones por la deshidratación de los minerales arcillosos. En líneas generales, para muestras granométricamente heterogéneas, es conveniente el secado a 50 °C por 2 a 3 días, estos tiempos podrán ser reducidos en materiales arenosos o gruesos por un incremento de la temperatura.

A.2) Desagregación. Con la finalidad de facilitar las siguientes etapas, el material seco es desagregado en rodillo o molino mecánico o manualmente con mortero. En algunos casos la desagregación debe realizarse en medio del proceso de secado para evitar que los terrones grandes conserven humedad. La trituración no debe sobrepasar el tamaño de grano, ya que de ser así se afectarían las partículas clásticas. Para el caso de sedimentos cementados por precipitados químicos, debe recurrirse a procedimientos alternativos que dependen de la naturaleza química del cementante.

A.3) Obtención de la alicuota. La alicuota a procesar debe ser representativa de la muestra; para ello, se puede utilizar cuarteadores mecánicos o realizar un cuarteo manual (Bertoldi de Pomar, 1976). El volumen de la alicuota es variable (de 5-100 gr), dependiendo del tipo de sedimento y la finalidad del estudio.

B) Tratamiento preliminar

B.1) Eliminación de sales solubles. La alicuota es lavada con agua destilada en varias oportunidades. Con el fin de eliminar todas las sales solubles es conveniente que uno de los lavados se realice a calentamiento moderado (60 -70°, con la precaución de nunca llegar a ebullición). Si es necesario conservar todos los tamaños de partículas, es conveniente que el lavado de la muestra se realice en filtro de vacío o poroso; de no ser así puede sifonarse el agua de lavado teniendo en cuenta el tiempo de decantación del tamaño de partícula que se desea conservar. Para un diámetro de partícula superior a 7,8 µm, de 28 a 32' (de 22 a 18 °C respectivamente) son suficientes para lograr la decantación (cuadro 1).

B.2) Eliminación de carbonatos. La presencia de carbonatos en la muestra puede constatarse mediante el agregado de gotas de HCl a una sub-muestra; si la muestra no posee carbonatos (ausencia de desprendimiento gaseoso) puede continuarse directamente con el paso B.3. En caso contrario, para su eliminación se utiliza una solución de HCl diluido al 10% con calentamiento moderado (también puede utilizarse ácido acético en solución *buffer* a pH 3 (*sensu* Barboni *et al.*, 1999), si bien no es recomendable llegar a pH tan cercanos a los valores de solubilidad de la sílice), reiterando este tratamiento

hasta que la falta de reacción indique la ausencia de carbonatos.

Debe tenerse en cuenta que con la eliminación de carbonatos en esta etapa se están eliminando además de los compuestos minerales cementantes, algunos minerales cálcicos y calcifitolitos; de modo que, según la finalidad de las investigaciones, se deberá considerar la realización de este ataque.

B.3) Dispersión. La agregación del material clástico es ocasionada principalmente por la presencia de materia orgánica o por la elevada cantidad de partículas arcillosas. Con la finalidad de liberar los componentes individuales de la muestra y facilitar posteriores tratamientos, se realiza una dispersión, utilizando hexametáfosfato de sodio o Calgón (pirofosfato de sodio o sodio beta). Para el caso del hexametáfosfato de sodio se utiliza una solución 0,1 N, preparada al momento de realizar el procesamiento. Para ello, en probetas de 1000 ml se agrega paulatinamente a la muestra la solución, agitando por 5-10'; luego se deja actuar por 24 horas, alternando la agitación y sedimentación en este lapso de tiempo. Se puede utilizar también batidora mecánica, lo que reduce considerablemente la duración de esta etapa a unas horas. Si el dispersante utilizado es Calgón se debe aplicar en una solución al 5%.

B.4) Eliminación de materia orgánica. La materia orgánica debe ser eliminada de las muestras ya que, de estar presente, facilita la agregación del material y esto dificulta la separación densimétrica, impidiendo la libre flotación de los fitolitos. Por otra parte, los restos orgánicos independientes flotarán con el líquido pesado, dificultando la observación en los preparados microscópicos. Si bien mucha de la materia orgánica puede ser eliminada con el líquido sobrenadante de los pasos previos, o por tamizado para el caso de restos orgánicos macroscópicos, los restos finos, alterados o no, deben ser eliminados por un ataque químico con sustancias oxidantes que no afecten los minerales. La eliminación se realiza utilizando H_2O_2 (20 ó 30 volúmenes) en frío durante 24 horas, o en caliente (100-120 °C), con agregado de H_2O_2 hasta no observar desprendimiento gaseoso.

Una alternativa más violenta es tratar las muestras con $KMnO_4$ al 5% y agregado de algunas gotas de H_2SO_4 ; se deja actuar durante 24 horas en frío con agitación periódica de la solución. Posteriormente se agrega el H_2O_2 al 10% hasta total decoloración de la solución, calentando luego a 100 °C hasta total desprendimiento del oxígeno libre.

B.5) Eliminación de barnices y/o cementos. Esta etapa consta de un segundo tratamiento con solución de HCl diluido al 10%. Se ha observado que en algunas muestras, en este momento del procesamiento, pueden aparecer barnices o cementos liberados como resultado de los ataques realizados en los pasos B.4 y B.5. La presencia de barnices de hierro se evidencia por una coloración amarillenta de la solución, mientras que la presencia de carbonatos se evidencia por la efervescencia producida por el ataque ácido. El tratamiento con la solución ácida se reiterará hasta que el líquido sobrenadante quede limpio y no se observe reacción. Si persiste la presencia de óxidos de hierro, el tratamiento puede intensificarse agregando cristales de Cl_2 Sn a la solución de HCl, cuidando siempre que el pH se mantenga entre valores de 4,5 - 8,5.

Si el sedimento posee pirita, como por ejemplo hemos observado en sedimentos holocenos de Mar Chiquita (Buenos Aires), su eliminación puede lograrse tratando la muestra con HNO_3 diluido en caliente, pero se corre el riesgo de afectar algunos minerales.

B.6) Neutralización. Para la etapa final de limpieza de muestra, se debe realizar un riguroso lavado con agua destilada hasta eliminar todo indicio de acidez. Esta ausencia se comprueba mediante el uso de indicadores de papel tornasol.

C) Separación granométrica

Los pasos de esta separación deberán modificarse de acuerdo a la finalidad del trabajo. Con el objeto de enumerar las pautas básicas de la separación, se describirá la obtención de tres fracciones: fina (diámetro de partícula menor a 7,8 μm), mediana (entre 7,8 - 250 μm) y gruesa (mayor a 250 μm). Si la intención es ajustar los análisis a otros diámetros de partículas, esto se puede lograr mediante la variación de los tiempos de sifonado (para los diámetros menores) y/o el uso de distinto tamaño de malla de tamizado (para los diámetros mayores).

C.1) Sifonado. La "muestra limpia" es colocada en una probeta de 1000 ml y se le agrega agua destilada hasta un aforo que llamaremos el cero de sifonado. Este método, basado en la Ley de Stokes, consiste en homogeneizar el contenido de la probeta mediante una enérgica agitación y la posterior decantación de las partículas. Para una temperatura determinada, la velocidad de decantación variará en función del tamaño de partícula según se detalla en el cuadro 1. Para separar la fracción fina (partículas menores a 7,8 μm de diámetro), a una temperatura de 20 °C, el sifonado se efectuará a una profundidad de 10 cm por debajo del cero de sifonado, haciendo la toma a los 30' 26". De esta etapa se obtendrá una fracción fina (por filtrado del líquido sifonado), quedando las restantes fracciones en el líquido de decantación.

C.2) Tamizado. El remanente de la etapa anterior es filtrado y secado (fracción mediana y gruesa). Para el caso en descripción el tamizado se realizará con malla de 250 μm , separando la fracción gruesa de la mediana; pudiéndose agregar distintos tamaños de tamices a la columna de acuerdo a las fracciones que se desean obtener. Es recomendable la realización de un tamizado en húmedo, para evitar que posibles agregados de desecamiento de las partículas impidan su correcto fraccionamiento.

D) Separación densimétrica

De acuerdo a los rangos de tamaño, la fracción mediana (7,8 - 250 μm de diámetro) es la principal portadora de fitolitos, tanto de micro como macrofitolitos (*sensu* Bertoldi de Pomar, 1971); no obstante, la separación densimétrica puede realizarse también en la fracción gruesa.

D.1) Tareas previas. Se debe asegurar el perfecto estado de sequedad de la muestra, ya que de estar húmeda, la película de agua superficial producirá la aglomeración de las partículas por tensión superficial y eso puede provocar el arrastre del material liviano durante la separación densimétrica.

La selección del líquido pesado a utilizar se encuentra en función de la densidad necesaria para separar los fitolitos del material mineral. Los fitolitos poseen un peso específico entre 1,5 a 2,3 (Jones y Beavers, 1963; Wilding y Drees, 1968); dentro del rango de pesos específicos de los minerales sedimentarios más comunes, los minerales livianos (tales como las ortoclasas, calcedonia, oligoclasa y cuarzo) no poseen un peso específico inferior a 2,54, lo cual brinda una diferencia que permite la separación mediante un método densimétrico. El mayor inconveniente se presenta con los vidrios volcánicos (peso específico 2,20 - 2,27), los cuales se encuentran dentro del rango de los fitolitos, y son inevitablemente separados con la fracción fitolítica. Al respecto, existe un método para la diferenciación óptica del ópalo organógeno y los vidrios volcánicos propuesto por Teruggi (1955), al cual se hace referencia en el último apartado de esta metodología. Una vez seleccionado el rango de densidades, es posible establecer el líquido pesado a utilizar. Si bien en el pasado el bromoformo (tribromometano) fue el líquido pesado de mayor uso, ha sido paulatinamente reemplazado

Cuadro 1. Tasas de sedimentación de partículas en relación al diámetro de partícula y la temperatura / *Particle sedimentation rates related to particle diameter and temperature.*

Diámetro de partícula (µm) *	Profundidad (cm)**	Tiempo de sedimentación				
		a 18 °C	a 19 °C	a 20 °C	a 21 °C	a 22 °C
62,5	20	20"	20"	20"	20"	20"
44,2	20	2' 0"	1' 57"	1' 54"	1' 51"	1' 49"
31,2	10	2' 0"	1' 57"	1' 54"	1' 51"	1' 49"
22,1	10	4' 0"	3' 54"	3' 48"	3' 42"	3' 37"
15,6	10	8' 0"	7' 48"	7' 36"	7' 25"	7' 15"
7,8	10	31' 51"	31' 11"	30' 26"	29' 41"	28' 59"
3,9	5	63' 58"	62' 22"	60' 51"	59' 23"	57' 58"
1,95	5	4 hs 16'	4 hs 9'	4 hs 3'	3 hs 58'	3hs 52'
0,98	5	17 hs 30'	16 hs 38'	16 hs 14'	15 hs 50'	15 hs 28'
0,49	5	68 hs 14'	66 hs 32'	64 hs 54'	63 hs 20'	61 hs 50'

* Límite superior del rango de diámetro de partícula. ** Distancia con respecto al "cero de sifonado".

por el empleo de solución de ioduro de cadmio y potasio, o de cloruro de zinc en la pasada década (Mulholland, 1985). Actualmente, en el mercado existen dos sustancias cuyos nombres genéricos son polytungstato de sodio y metatungstato de litio. Las mismas permiten en solución acuosa obtener un líquido pesado que se ajusta al peso específico requerido para esta separación, con un elevado porcentaje de reciclado y, a diferencia de los anteriormente utilizados, con un grado de toxicidad mínimo para el operario y para el medio ambiente.

En el caso personal se ha utilizado el polytungstato de sodio en solución acuosa. El control del peso específico del líquido pesado puede realizarse mediante el uso de balanza de Westphal, picnómetro o densímetro, para una medición exacta, o bien por medio de indicadores de Kranz (Bertoldi de Pomar, 1976) los que brindan una medición por rango de densidades.

D.2) Separación densimétrica. Para esta separación se puede utilizar ampollas de decantación o embudo de vidrio adaptado para decantación mediante un tubo de goma con pinza de presión, o bien mediante centrifugación en tubo de ensayo, ya sea directamente o por la técnica del doble tubo. Este dispositivo se logra mediante un tubo de vidrio o plástico transparente de base cónica perforada (con una perforación no mayor de 4 mm de diámetro) que es calzado, mediante un tapón de goma perforado, dentro de un tubo de centrífuga. Una vez ajustado el tubo interno de modo tal de dejar suficiente espacio entre el fondo de ambos tubos, se agrega el líquido pesado aproximadamente hasta la mitad de su capacidad. Posteriormente, se esparce la alícuota de muestra (su volumen estará de acuerdo a la capacidad de los tubos utilizados) por la boca del tubo interno, tratando de evitar la formación de grumos. Paso seguido, se vuelve a agregar el líquido pesado en

Cuadro 2. Índices de refracción de los medios de montaje / *Refraction indexes of mounting media.*

Medio de montaje	Índice de refracción	Tipo de preparado
Glicerina-gelatina	1,450	Sólido
Glicerina	1,470	Líquido
Vaselina líquida o petrolato	1,480	Líquido
Estirolita	1,517	Sólido
Aceite de cedro o de inmersión	1,518	Líquido
Bálsamo de Canadá	1,534	Sólido
Aceite de clavo	1,544	Líquido
PVK	1,696	Sólido

forma suave para evitar corrientes que pueden arrastrar los materiales livianos, hasta aproximadamente 3/4 del tubo. Los tubos correctamente cerrados se centrifugan, evitando sobrepasar las 1200 RPM. Los tiempos de centrifugado se ajustarán de acuerdo a la composición granulométrica de la muestra (para arenas bastará con 2-5' incrementándose los tiempos gradualmente para muestras de partículas menores). Una vez concluida la centrifugación, se extrae el tubo interno y el líquido es filtrado con papel de filtro obteniendo la fracción liviana; paralelamente es filtrado también el líquido del tubo externo con lo que se obtiene la fracción pesada. Con esta técnica se minimizan las posibilidades de mezcla de ambas fracciones, que son frecuentes cuando se realiza la separación en un único tubo.

De utilizarse ampolla de decantación o embudo de vidrio, una vez dispuestos en su soporte, se cierra el robinete o pinza y se llena hasta la mitad de la ampolla con el líquido pesado; se esparce la alícuota de muestra seca sobre la superficie del líquido, y se enrasa hasta el nivel de mayor diámetro de la ampolla o 3/4 del embudo, agitando con varilla de vidrio para evitar la formación de grumos. El tiempo necesario para la separación dependerá del tipo de muestra, y se incrementará a medida que el tamaño de partícula sea menor. Una vez que el líquido pesado se torna límpido y el material (tanto el superior como el inferior) no muestra grumos, se realiza la separación y filtrado de ambas fracciones.

E) Obtención de preparados microscópicos

Los fitolitos poseen un índice de refracción (IR) de 1,410 - 1,465, con un valor medio de 1,458 (Teruggi, 1955; Jones y Beavers, 1963); para lograr un buen contraste se necesitará utilizar un medio de montaje cuyo IR sea levemente superior y que se mantenga dentro del rango del IR del vidrio empleado en el instrumento óptico (normalmente entre 1,500 a 1,600).

Los medios de montaje pueden ser líquidos o sólidos; los líquidos permiten el movimiento de los fitolitos, facilitando su rotación y su observación en los distintos planos; la desventaja de este tipo de preparados es que se conservan por menos tiempo que los sólidos. En la cuadro 2 se enumeran algunos de los medios de montaje utilizados. Según los distintos autores para el montaje de los fitolitos se puede utilizar vaselina, aceite de clavo (Teruggi, 1955), Estirolita (Powers, 1989), Permout, Bálsamo de Canadá (Piperno, 1988), PVK o poly (N-vinylcarbazole) (Kaplan, 1988).

Para diferenciar los fitolitos del vidrio volcánico (IR: 1,480 - 1,612) presente en la fracción liviana, Teruggi (1955) propone realizar los preparados microscópicos con vaselina líquida o

petrolato (IR: 1,480), este medio separa ópticamente dos grupos: uno de índice de refracción inferior (constituido casi completamente por el ópalo) y otro de índice superior en el que se encuentra el vidrio y otros componentes minerales.

En nuestros estudios se ha logrado una considerable diferenciación óptica mediante el uso de aceite de cedro o líquido de inmersión (IR: 1,518). La técnica de montado con medio líquido consiste en colocar una gota del medio sobre un portaobjeto limpio, esparcir homogéneamente una alícuota de la fracción liviana y cubrir con cubreobjeto de modo de evitar que el líquido realice corrientes que puedan arrastrar el material. El sellado se puede realizar mediante el uso de parafina o esmalte de uñas. Mientras que para medios sólidos, como Bálsamo de Canadá, la técnica consiste en colocar una gota de bálsamo sobre el portaobjeto limpio, esparcir homogéneamente una alícuota de la fracción y deslizar suavemente el cubreobjetos previamente humedecido en xilol; el preparado se presiona suavemente hasta la distribución uniforme del bálsamo, manteniéndolo presionado con la ayuda de clips, mientras se secan a estufa.

Agradecimientos

Deseamos agradecer a los colegas que, mediante su revisión de este manuscrito, han permitido mejorar su contenido.

Bibliografía

- Barboni, D., Bonnefille, R., Alexandre, A. y Meunier, J.D. 1999. Phytoliths as paleoenvironmental indicators, West Side Middle Awash Valley, Ethiopia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 152: 87-100.
- Bertoldi de Pomar, H. 1971. Ensayo de clasificación morfológica de los silicofitolitos. *Ameghiniana* 8: 317-328.
- Bertoldi de Pomar, H. 1976. Métodos de preparación de sedimentos clásticos para su estudio microscópico. I. Tratamientos previos. *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* 7: 1-55.
- Fredlund, G. 1986. Problems in the simultaneous extraction of pollen and phytoliths from clastic sediments. En: I. Rovner (ed.), *Plant opal phytolith analysis in archaeology and paleoecology*. Proceeding of the 1984 Phytolith Research Workshop, North Carolina: 102-109.
- Jones, R.L. y Beavers, A.H. 1963. Some mineralogical and chemical properties of plant opal. *Soil Science* 96: 375-379.
- Kaplan, L. 1988. A high refractive index mounting medium for optical photomicrography of phytolith. *The Phytolitharien Newsletters* 5: 6-7.

- Kondo, R., Sase, T. y Kato, Y. 1987. Opal phytolith analysis of aridisols with regard to interpretation of paleovegetation. En: D. I. Kinloch (eds.), *Proceeding of the 9th international soil classification workshop* (Japón. Obihiro) : 520-534.
- Mulholland, S.C. 1985. Zinc Bromide heavy liquid preparation. *The Phytolitharien Newsletters* 3: 3-5.
- Pearsall, D.M. 2000. *Paleoethnobotany. A handbook of procedures*. 2nd ed. Academic Press. San Diego, 700 p.
- Piperno, D.R. 1988. *Phytolith analysis. An Archaeological and geological perspective*. Academic Press. San Diego, 280 p.
- Powers, A.H. 1989. The use of styrolite as a mounting medium in phytolith analysis. *The Phytolitharien Newsletters* 6: 6-8.
- Rovner, I. 1990. Extracción de fitolitos de muestras de suelos. *Antropológicas* 4: 49-53.
- Teruggi, M.E. 1955. Algunas observaciones microscópicas sobre vidrio volcánico y ópalo organógeno en sedimentos pampianos. *Notas del Museo de La Plata* 18, *Geología* 66: 17-26.
- Wilding, L.P. y Drees, L.R. 1968. Biogenic opal in soils as an index of vegetative history in the Prairie Peninsula. En: R.E. Bergston (ed.), *The Quaternary of Illinois, Special publication* (College of Agriculture, University of Illinois, Urbana)14: 96-103.
- Wilding, L.P. y Drees, L.R. 1971. Biogenic opal in Ohio soils. *Soil Science Society of America Proceedings* 35: 1004-1010.

Recibido: 2 de mayo de 2001.

Aceptado: 21 de marzo de 2002.

Se terminó de imprimir el 30 de setiembre de 2002 en los Talleres Gráficos del Instituto Salesiano de Artes Gráficas Don Bosco 4053, Buenos Aires, Argentina
El armado estuvo a cargo de Vergara Oroño-Frascarelli ediciones Tucumán 3087, Buenos Aires, Argentina