

## VARIACIONES DE UN METODO QUIMICO DE LIMPIEZA PARA LA PREPARACION DE VERTEBRADOS FOSILES

Fernando ABDALA<sup>1</sup> y Margarita HIDALGO<sup>2</sup>

ABSTRACT: *VARIATIONS OF A CHEMICAL CLEANING METHOD TO PREPARE FOSSIL VERTEBRATES.* The specific action of complex agents in the dissolution of iron matrix is underlined in this work. Fossil fragments from Puesto Viejo Formation (Scitian) were treated at different concentrations of thioglycolic acid (TGA), Mohr salt and pH. It was noted that at: TGA = 5 %; Fe(II) = 0,3 % and pH 3,90 the matrix dissolution was best. Finally the chemical cleaning method used on the skull of the carnivorous cynodont *Cynognathus minor* Bonaparte is described. As a result, structural details not described until now were observed.

KEY WORDS: Chemical cleaning, Thioglycolic acid, Mohr salt, Fossil vertebrates.

PALABRAS CLAVE: Limpieza química, Acido tioglicólico, Sal de Mohr, Vertebrados fósiles.

### INTRODUCCION

En el procedimiento general de recuperación y conservación de vertebrados fósiles, la limpieza química constituye una etapa de gran importancia como complemento de los procedimientos mecánicos tradicionales. Es por ésto que se ha dedicado gran esfuerzo al desarrollo de técnicas de laboratorio que permitan una limpieza efectiva de los restos fósiles a través de la disolución de las matrices que los contienen. De esta manera es posible apreciar detalles estructurales que facilitan el estudio de los mismos.

En la actualidad es bien conocido el uso de distintas soluciones de agentes disolventes para la limpieza de vertebrados fósiles, tales como, ácido acético, ácido fórmico y ácido tioglicólico (Toombs, 1948; Toombs y Rixon, 1956; Rudner, 1972; Howie, 1974; Rixon, 1976). La elección de las mismas depende de la naturaleza y características de la matriz que se desea eliminar.

Nuestros estudios están orientados a la recuperación de vertebrados fósiles que se encuentran cubiertos por matrices de origen ferruginoso. Los antece-

denes existentes al respecto presentan algunos puntos que consideramos necesario analizar, con el propósito de aclarar ciertos aspectos referentes a la metodología de trabajo. En esta contribución se presenta un breve análisis de los antecedentes y los resultados experimentales de un estudio sobre disolución de una matriz ferruginosa, introduciendo una innovación en un método tradicional como es el del ácido tioglicólico.

### ANTECEDENTES

En el desarrollo de técnicas de limpieza de vertebrados fósiles, es ampliamente conocido el empleo de soluciones de diferentes ácidos para disolver matrices rocosas que acompañan al fósil (Rixon, 1976). La elección de estos agentes disolventes no es arbitraria, sino que depende de las características y naturaleza de la matriz (Toombs y Rixon, 1959). Así por ejemplo, es reconocida la eficiencia del ácido acético en el tratamiento de fósiles cubiertos por una matriz calcárea (Rudner, 1972) y del ácido tioglicólico (TGA) en aquéllos que presentan una matriz ferruginosa (Howie, 1974).

El hecho de emplear soluciones de diferentes ácidos como agentes disolventes no significa que la eficiencia de las mismas se deba precisamente a sus características ácidas. Es decir, el protón proveniente del ácido no necesariamente debe intervenir directamente en el proceso de disolución. El papel que jue-

<sup>1</sup> Becario del CONICET, Sección Paleozoología II, Facultad de Cs. Naturales e Instituto Miguel Lillo, UNT, Miguel Lillo 205, 4000 Tucumán.

<sup>2</sup> Cátedra de Química II, Facultad de Cs. Naturales e Instituto Miguel Lillo, UNT, Miguel Lillo 205, 4000 Tucumán.

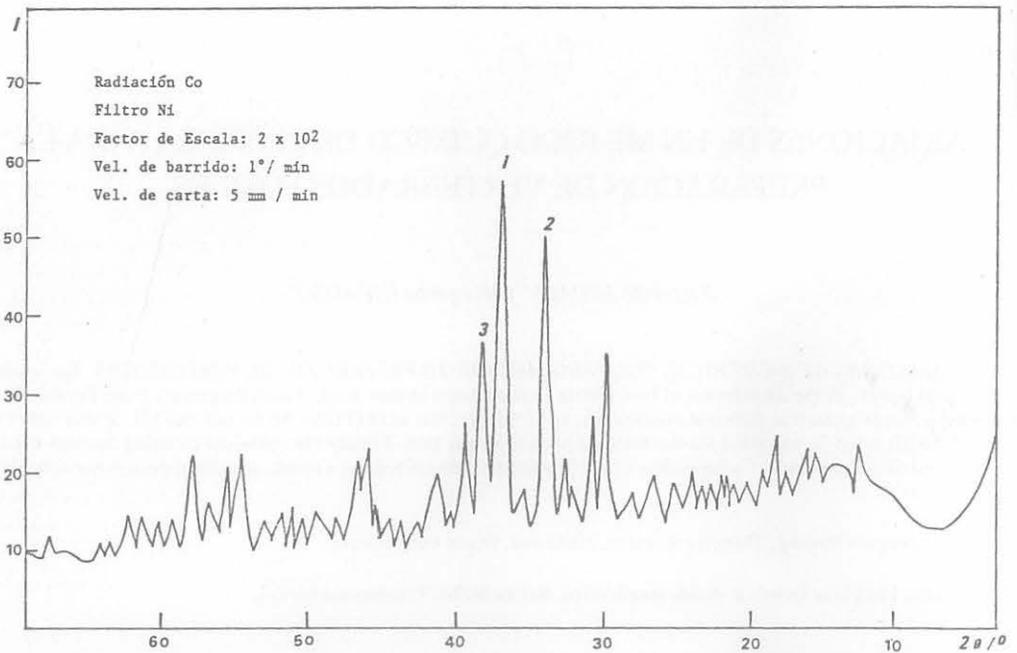


Figura 1. Diagrama de difracción de Rayos X de un fragmento fósil no asignado, procedente de la Formación Puesto Viejo. Se observa la variación de la intensidad relativa ( $I$ ) en función del ángulo de barrido ( $2\theta$ ) y la presencia de reflexiones características de fosfatos (1), carbonatos (2) y hematita (3).

ga esta especie depende del mecanismo involucrado en cada caso.

Por ejemplo, en el caso de matrices calcáreas, la acidez provocada por un ácido débil, como el acético, es suficiente para protonar el anión carbonato y provocar la disolución de la matriz. Aquí, el protón interviene directamente en el proceso de disolución y en consecuencia, se debe tener extremo cuidado en eliminar todo resto de acidez al terminar el tratamiento, ya sea por lavado o por neutralización, para evitar daños irreparables en las muestras fósiles (Rudner, 1972; Toombs, 1948).

En el caso de matrices ferruginosas cambia el panorama. Para que intervenga directamente el protón, sería necesario el uso de soluciones fuertemente ácidas dado que los óxidos que las componen, óxidos u oxohidróxidos de hierro (III), son solubles sólo en soluciones que contienen una elevada concentración de iones hidrógeno. Sin duda, estas soluciones producirían simultáneamente un ataque irreversible del fósil y probablemente su destrucción. En estos casos se hace necesario recurrir al empleo de métodos menos agresivos como por ejemplo el uso de agentes complejantes y/o reductores, quienes en líneas generales actúan de la siguiente manera:

**a. Agentes Complejantes:** ácidos carboxílicos o aminopolicarboxílicos que complejan el ion metálico superficial, debilitando de esta manera la

unión ion metálico/oxígeno, originando alteraciones en la red cristalina y como consecuencia su disolución (Baumgartner *et al.*, 1983; Blesa *et al.*, 1984).

**b. Agentes Reductores:** en general se trata de iones metálicos o iones complejos que disminuyen el estado de oxidación del ion metálico superficial, debilitando también de esta manera la unión ion metálico/oxígeno (Blesa y Maroto, 1982).

En estos casos no es el ion hidrógeno la especie activa sino que su presencia es la que determina la fracción con que intervendrá la especie realmente activa: el anión de los ácidos carboxílicos o aminopolicarboxílicos, el ion complejo, o bien el ion metálico. La proporción en que cada una de estas especies se encuentra presente en un sistema, es función de la concentración de los iones hidrógeno (Burriel Martí *et al.*, 1985). Se puede decir en estos casos que el ion hidrógeno no interviene directamente en el proceso de disolución, sino que lo hace a través de la especiación de la especie activa.

Por ejemplo, para la limpieza de vertebrados fósiles cubiertos por una matriz ferruginosa es bien conocido el uso del TGA (Howie, 1974). El TGA actúa como un eficaz agente reductor y complejante para el hierro. El anión tioglicolato compleja tanto al Fe (II) como al Fe (III) y reduce a este último por una transferencia electrónica intramolecular a Fe (II).



Figura 2 a. Vista lateral izquierda del cráneo de *Cynognathus minor*, 1- antes del tratamiento químico, 2- después del tratamiento químico de limpieza. b. Vista externa del extremo posterior de la rama mandibular de *C. minor*, 1- antes del tratamiento químico y 2- después del tratamiento químico de limpieza.

(Baumgartner *et al.*, 1982). El método propuesto por Howie es sencillo y efectivo pero aparentemente largo. La pieza previamente protegida es sometida a sucesivas inmersiones en una solución acuosa al 5 % en TGA y 0,9 % en ortofosfato de calcio. El número de inmersiones y tiempo de permanencia depende de las dimensiones del fósil. Se produce, de esta manera, un ablandamiento de la matriz, la cual es removida mediante un cepillado suave con abrasivo. Finalmente el material es lavado durante un tiempo prolongado con agua corriente y desionizada.

Otro ejemplo del uso de agentes complejantes se tiene en el método usado por Blum *et al.* (1989), basado en una técnica empleada en mineralogía para remover costras ferruginosas (Waller, 1980). En este caso, primero se reduce el hierro (III) a hierro (II) usando un agente reductor, ditionito de sodio, y luego el hierro (II) es disuelto en una solución neutra que contiene un agente complejante, ácido cítrico. Blum *et al.* (1989) desarrollaron esta técnica señalando ciertas desventajas respecto al uso del ácido tioglicólico, fundamentalmente en lo referente a sus características ácidas.

En ambos tratamientos con agentes complejantes, los autores destacan el cuidado que se debe tener en la eliminación de los restos de acidez posterior al tratamiento. Sin embargo, dada la especificidad con que actúa un agente complejante sobre un ion metálico, ya sea en solución o superficialmente, tales cuidados no serían necesarios, dado que el protón no intervendría directamente en el proceso de disolución, sino que lo haría a través de la especiación de los aniones correspondientes (tioglicolato y citrato). Estos, por medio de un proceso de complejación superficial, actuarían como verdaderos agentes disolventes de la matriz.

La especificidad con que actúa un complejante es un factor muy importante en procesos de limpieza superficiales, dado que garantiza el ataque sólo a la porción de la muestra que se desea eliminar.

Si se analizan atentamente los métodos empleados para la disolución de matrices férricas (Howie, 1974 y Blum *et al.*, 1989), se observa que ambos involucran procesos de reducción y complejación. Esto se conoce con el nombre de disolución reductiva (Segal y Sellers, 1982) y ha sido comprobada y ampliamente utilizada para la disolución de óxidos metálicos en sistemas de tipo industrial (superficies metálicas sometidas a presión y temperatura).

En este tipo de sistemas, muchas veces la presencia de un reductor en el medio, representa un factor de gran importancia desde el punto de vista cinético (Segal y Sellers, 1982). Esto constituye un detalle de gran importancia, fundamentalmente en aquellos procesos que requieren mucho tiempo. Así por ejemplo, en el caso de óxidos de Fe (III), el ion Fe (II) actúa como un efectivo catalizador (Blesa y Maroto, 1982).

EXPER. PRUEBA	CONDICIONES EXPERIMENTALES	OBSERVACIONES
1	TGA = 6 % Fe(II) = 0,1 % pH = 2,5 Tiempo de inmersión: 5 días	a- ablandamiento de matriz b- presencia de Fe disuelto en solución c- remoción mecánica de matriz d- Sup. cubierta del hueso con matriz roja $\approx$ 20 %
2	Sol. = idem. 1 Tiempo de inmersión: 9 días	Idem 1
3	TGA = 1 % Fe(II) = 0,8 % pH = 2,25 Tiempo inmersión: 5 días	Idem. 1 d- Sup. cubierta del hueso con matriz roja $\approx$ 90 %
4	TGA = 6 % Fe(II) = 4 % pH = 1,85 Tiempo de inmersión: 5 días	a- ablandamiento de matriz b- presencia de Fe disuelto en solución c- No hubo remoción mecánica de matriz d- Sup. cubierta del hueso con matriz roja $\approx$ 20 %
5	Sol = idem 4 Tiempo inmersión: 5 días	a-inmersión de huesos de mayor tamaño b- Uso de resina protectora sobre las partes óseas descubiertas
6	TGA = 5 % Fe(II) = 0,3 % Tiempo inmersión: 2 días	a- ablandamiento de matriz b- presencia de Fe disuelto en la solución c- limpieza efectiva de la matriz ferruginosa
7	Sol. = idem. 6 pH = 2,90 Tiempo inmersión: 7 días	Idem. 6 d- remoción mecánica de la matriz
8	Sol. = Idem. 6 pH - 3,90 Tiempo inmersión: 4 días	Idem. 6
9	Sol. = idem. 6 pH = 7,05 Tiempo inmersión: 7 días	a- endurecimiento de la matriz b- viraje del color del hueso a una tonalidad muy oscura

Tabla I. Pruebas experimentales llevadas a cabo para determinar las condiciones de: concentración de ácido tioglicólico (TGA), de Fe (II), de protones y tiempo necesario de inmersión para la limpieza de la matriz ferruginosa.

#### LIMPIEZA QUIMICA DE *CYNOGNATHUS MINOR* BONAPARTE

En base a los antecedentes mencionados, se sometió material fragmentario procedente de la Formación Puesto Viejo a experimentación con diferentes concentraciones de TGA y hierro (II), considerándose igualmente variaciones de pH, tiempo y tamaño de los fragmentos (ver Tabla 1). A partir de estas pruebas se determinaron las condiciones necesarias para disolver la matriz ferruginosa sin afectar el componente óseo de la muestra. Una vez establecidas dichas condiciones, se realizó una preparación química del cráneo de *Cynognathus minor*.

Los restos de este ejemplar presentaban una capa ferruginosa de aproximadamente 2 mm en las zonas planas, siendo mayor su espesor en las concavidades del cráneo. Esta capa cubría la pieza en gran parte, impidiendo la observación clara de suturas entre distintos elementos óseos del cráneo.

El espécimen proviene del Miembro Superior de la Formación Puesto Viejo del Scitiano de Mendoza (González Díaz, 1966). Dicho miembro, está constituido por areniscas y conglomerados con una marcada coloración rojiza y amarillenta (Ibáñez y Criado Roque, 1979). Este es portador de vertebrados fósiles tales como: dicinodontes kannemeyaridos, cinodontes traversodontidos y cinognátidos (Bonaparte, 1978).

## PROCEDIMIENTO

El cráneo del ejemplar de *C. minor* fue sometido a un tratamiento mecánico por medio de martillo neumático y buriles, con el que se removió gran parte del sedimento que rellenaba las aberturas temporales. Posteriormente se lo dividió en cinco fragmentos, lo cual permitió mayor comodidad en el manejo y control, así como una mayor área de exposición durante el tratamiento químico.

Para identificar la composición de la matriz roja que cubría el cráneo, se sometió una muestra (fragmento de material no asignado) a difracción de rayos X empleando el método de polvo en un difractómetro marca Philips, modelo P.W. 1010. Como resultado se obtuvo un diagrama que presentaba picos característicos de fosfatos, calcita y hematita ( $Fe_2O_3$ ) (fig. 1).

Una vez determinada la presencia de  $Fe_2O_3$  en la matriz se realizó una serie de pruebas a fin de establecer las condiciones apropiadas para disolverla. Las mismas implicaron variaciones en:

- Concentración del agente disolvente.
- Concentración del catalizador
- pH
- Tiempo de inmersión
- Tamaño de las piezas

Como agente disolvente se seleccionó el ácido tioglicólico. En forma previa se realizaron ensayos con otros complejantes tales como ácido oxálico y ácido nitrilotriacético. En el valor de concentraciones empleado (1 % y 5 %) estos agentes no fueron efectivos. Para las pruebas con ácido tioglicólico se utilizaron concentraciones al 1 %, 5 % y 6 %.

Si bien existen antecedentes del uso con éxito del TGA en la limpieza de vertebrados fósiles (Howie, 1974), en este caso se introduce una variación sobre el método propuesto, como ser la incorporación de sal ferrosa en su forma de sal de Mohr ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$ ). Esta sal provee iones hierro (II) ( $Fe(II)$ ) a la solución, los cuales actuarían como catalizadores del proceso de limpieza (ver introducción). En los ensayos se usaron concentraciones de  $Fe(II)$  de 0,1 %, 0,3 %, 0,8 % y 4 %.

Se estudiaron rangos de concentraciones de iones hidrógeno que corresponden a valores de pH de 2,00, 2,90, 3,90 y 7,05. Los valores de pH fueron ajustados mediante el agregado de soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

Dada la necesidad de ir protegiendo las partes óseas que quedaban expuestas, se probó durante los ensayos, una resina usada en la industria de la construcción para proteger el cemento del ataque de ácidos ("Satin Cement Seal"). Los resultados obtenidos fueron muy buenos, dado que la capa protectora formada por este compuesto permanecía inalterada en

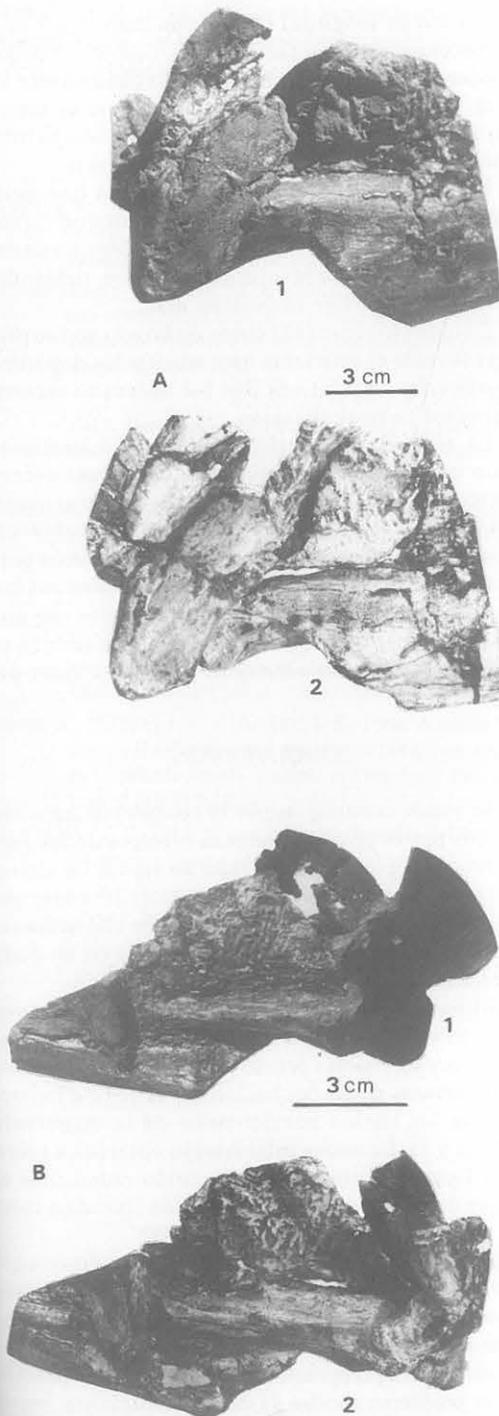


Figura 3 a. Vista externa del extremo posterior del dentario y huesos postdentarios de la rama mandibular izquierda de *C. minor*, 1- antes del tratamiento químico y 2- después del tratamiento químico de limpieza. b. Vista interna del extremo posterior del dentario y huesos postdentarios de la rama mandibular izquierda de *C. minor* 1- antes del tratamiento químico y 2- después del tratamiento químico de limpieza.

contacto con la solución, y se podía continuar el tratamiento en zonas con una cubierta más gruesa de la matriz.

Es importante proteger con la resina desde el inicio del tratamiento las regiones que están soldadas con pegamento (tipo poxipol), dado que al contacto con la solución se ablandan con facilidad. Esta precaución ha de tenerse en cuenta especialmente en materiales que previamente hayan sido sometidos a tratamientos mecánicos, dado el uso de dicha clase de pegamento para soldar los fragmentos que se fueron separando en esa fase de la preparación.

Una vez inmerso el material, se siguió una metodología de control, consistente en la observación del mismo a simple vista y con lupa cada 24 o 48 horas, con inmersión de 2 hs en agua corriente y destilada y la protección con la resina de las partes óseas descubiertas.

## RESULTADOS

Las características experimentales de las pruebas realizadas se pueden apreciar en la Tabla 1.

Las pruebas de disolución se llevaron a cabo sobre fragmentos de material disponible, que a pesar de haber sido seleccionados cuidadosamente, no guardaban estricta uniformidad en cuanto a volumen y forma de las piezas y a superficie y espesor de la matriz. Por este motivo los resultados no pueden ser comparados rigurosamente, dado que en un mismo ensayo se produjeron variaciones de diferentes parámetros simultáneamente. Sin embargo es notable, en un contexto general, la influencia que ejerce tanto la concentración de TGA como el pH de la solución.

Puede observarse que cuanto mayor es la concentración de TGA, mayor es el efecto disolvente que ejerce el ácido (ver Pruebas 1, 3 y 6 de Tabla 1). No ocurre lo mismo con el Fe (II), el cual es más efectivo en concentraciones bajas (ver pruebas 1, 4 y 6 de Tabla 1). Con respecto al pH, puede notarse que existe un valor, según nuestro criterio, óptimo, correspondiente a pH 3,90 (ver pruebas 6, 7, 8 y 9 de Tabla 1). No se considera adecuado el uso de pH 2 (prueba 6), ya que la disolución de la matriz se desarrolla con extrema rapidez dificultando un control más cuidadoso de los elementos inmersos.

Como resultados de las pruebas llevadas a cabo, se consideraron convenientes las siguientes condiciones:

TGA = 5 %  
Fe (II) = 0,3 %  
pH = 3,90

El tiempo de inmersión estuvo estrechamente relacionado, como era de esperar, con el tamaño de las piezas. Por ejemplo, para el caso específico de los fragmentos craneales de *C. minor*, los más pequeños

(6 a 12 cm de longitud) requirieron entre 5 y 7 días de procesamiento, en tanto que el tiempo total que estuvieron en inmersión fue de aproximadamente 72 horas. El fragmento craneal mayor (21 cm de longitud) tuvo 10 días de procesamiento y un tiempo total de inmersión de 120 horas aproximadamente.

Los restos fósiles empleados tanto en la experimentación como en la limpieza, no mostraron signos de deterioro posterior al tratamiento. Hay que destacar que la vida útil de la solución fue breve, debiéndose desechar la misma cada cinco días.

En todos los casos el tiempo de lavado no fue prolongado, sólo el suficiente para arrastrar los depósitos superficiales de reactivos. No fue necesario recurrir a procesos de neutralización.

En general, el material sometido al tratamiento sufrió un viraje de color, pasando de un rojo oscuro (típico de fósiles cubiertos con material ferruginoso) a un blancuzco. En ciertas regiones se logró observar suturas antes cubiertas o poco visibles (huesos postdentarios), ya que mientras el hueso tomaba una coloración más tenue, las suturas permanecían con una marcada coloración rojiza (Figs. 2 y 3). También se ha reconocido tejido esponjoso no visible antes del tratamiento.

## CONCLUSIONES

Se puede concluir, según el comportamiento observado por el sistema (limpieza efectiva de las partes cubiertas por la matriz, falta de signos de alteración de la base ósea, tiempos breves de lavados) que el ácido tioglicólico en presencia de Fe (II) actúa selectivamente sobre la matriz ferruginosa en un tiempo relativamente breve.

El desarrollo de la limpieza química del cráneo de *C. minor* permitió la observación de detalles osteológicos no visibles previo al tratamiento, especialmente suturas óseas del hocico, de la región temporal y de los huesos postdentarios de la mandíbula (Figs. 2 y 3). La nueva información obtenida a partir de la limpieza química, ha permitido redescubrir el cráneo de *C. minor*, tarea que ha sido llevada a cabo por uno de los autores (Abdala, 1989).

No debe dejar de considerarse que el método aquí descrito fue utilizado exclusivamente en fósiles provenientes de la Formación Puesto Viejo -Scitiano-. Estos resultados podrían significar un buen punto de partida para la preparación de materiales que presenten un problema similar de costra ferruginosa, como son, en Argentina, los de la Formación Ischigualasto -Carniano- y Formación Los Colordos -Noriano- entre otras.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo desean agradecer a los Dres. J. Powell y C. Apella y las Lic. G. Esteban y N.

Nasif por la lectura crítica y comentarios. Al Sr. Martín Vince por la excelente preparación mecánica, previa al tratamiento.

## BIBLIOGRAFIA

- ABDALA, F., 1989. Contribución al conocimiento de los cinodontes carnívoros argentinos. *Seminario inédito, Facultad de Ciencias Naturales, U.N.T.*
- BAUMGARTNER, E., BLESA, M. A. y MAROTO, A. J., 1982. Kinetics of the dissolution of magnetite in thioglycolic acid solutions. *Journal Chemical Society Dalton Transactions*, 78: 1649-1650.
- \_\_\_\_\_, MARINOVICH, H. y MAROTO, A. J., 1983. Heterogeneous electron transfer as pathway in the dissolution of magnetite in oxalic acid solutions. *Inorganic Chemistry*, 22: 2224.
- BLESA, M. A. y MAROTO, A. J., 1982. Mechanisms of oxide dissolution by acid chelating agents. Decontamination of nuclear facilities. Keynote addresses, P.J. Can. Nuc. Association and Am. Nuc. Soc. Eds.
- \_\_\_\_\_, BORGHI, E. B., MAROTO, A. J. y REGAZZONI, A. E., 1984. Adsorption of EDTA complexes on magnetite and the mechanism of dissolution of magnetite by EDTA. *Journal Colloid. Interf. Science*, 98: 295.
- BLUM, S., MAISEY, J. C. y RUTZKY, I. S., 1989. A method for chemical reduction and removal of ferric iron applied to vertebrate fossils. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 9 (1): 119-121.
- BONAPARTE, J. F., 1978. El mesozoico de América del Sur y sus tetrápodos. *Opera Lilloana*, 26.
- BURRIEL MARTI, F., LUCENA CONDE, F., ARRIBAS JIMENO, S. y HERNANDEZ MENDEZ, J., 1985. Química analítica cualitativa. Ed. Paraninfo, Madrid, España, pp. 1050.
- CRIBADO ROQUE, P. e IBAÑEZ, G., 1979. Provincia geológica San rafaélino-pampeana. En: Geología Regional Argentina. *Academia Nacional de Ciencias*, Vol. 1: 837-869. Córdoba.
- GONZALEZ DIAZ, E., 1966. El hallazgo del Infra ? mesotriásico continental en el sur del área pedemontana mendociniana. *Acta Geológica Lilloana*, VIII: 101-134.
- HOWIE, F. M., 1974. Introduction of thioglycolic acid in preparation of vertebrate fossils. *Curator*, vol. XVII, n. 2: 159-166.
- RIXON, A. E., 1976. Fossil animal remains: Their preparation and conservation. *Athlone Press*, London, 304 pp.
- RUDNER, I., 1972. Preparing fossils with acid -A step by step account. *Curator*, Vol. xv, N. 2: 121-130.
- SEGAL, M. G. y SELLERS, R. M., 1982. Kinetics of metal oxide dissolution. *Journal Chemical Society Faraday Transactions*, 78: 1149-1164.
- TOOMBS, H. A., 1984. The use of acetic acid in the development of vertebrate fossils. *Museum Journal London*, vol. 48: 54-55.
- \_\_\_\_\_, y RIXON, A. E., 1959. The use of acid in the preparation of vertebrate fossils. *Curator*, vol. I, n. 4: 304-312.
- WELLER, R. R., 1980. A rust removal method for mineral specimens. *Mineralogical Record*, 11: 109-110.

Original recibido el 17 de abril de 1990.

Aceptado el 19 de agosto de 1992.