

GIORGIO BELLUOMINI (*)

DATAZIONI DIRETTE DI OSSA FOSSILI UMANE PROVENIENTI DA SITI ARCHEOLOGICI DELL'ITALIA CENTRO-MERIDIONALE EFFETTUATE CON IL METODO DELLA RACEMIZZAZIONE DELL'ACIDO ASPARTICO

ABSTRACT: BELLUOMINI G., *Direct aspartic-acid racemization dating of human fossil bones from archaeological sites of Central-Southern Italy* (IT ISSN 0084-8948, 1980). A technique has been recently developed by Jeffrey L. BADA & alii, which is based on racemization of amino acids contained in collagen, namely aspartic acid. This paper describes the first application of this new technique to date some specimens of human and big-mammal faunal bones from the following archaeological sites of Central-Southern Italy: Palidoro, Grotta Maritza, Grotta La Punta, Grotta dell'Orso, Grotta dei Piccioni, Grotta Polesini, Grotta Paglicci and Riparo Vado all'Arancio.

The method enabled to directly date some important fragments of human bone weighing a few grams (*Homo Maritza*, *Homo Marsicanus*, child from the Paglicci burial, etc.) which it would have been impossible to radiocarbon date owing to the considerable amount of bone material that the latter method requires. Ages obtained with this dating technique were generally in good agreement with carbon-14 ages, the greatest difference being 18 % and the average one 8 %.

The procedure for extracting aspartic acid from fossil bones as well as the conditions relative to the synthesis of diastereomeric dipeptides L-leucyl-D-aspartic acid and L-leucyl-L-aspartic acid, necessary to measure the D/L ratio, are described. The procedure followed to identify the bone specimens which have been exposed to elevated temperatures is also indicated. Finally, in some samples having a carbon-14 age of less than 12,000 years, the influence of such environmental factors as pH, humidity and leaching on aspartic acid racemization rate was studied.

RIASSUNTO: BELLUOMINI G., *Datazioni dirette di ossa fossili umane provenienti da siti archeologici dell'Italia Centro-Meridionale effettuate con il metodo della racemizzazione dell'acido aspartico* (IT ISSN 0084-8948, 1980). Una tecnica per la datazione di reperti ossei, basata sulla racemizzazione degli ammino acidi contenuti nel collagene, con particolare riferimento all'acido aspartico, è stata recentemente messa a punto da J. L. BADA e collaboratori.

Nel presente lavoro si descrive questa nuova tecnica e la sua prima applicazione alla datazione di alcuni reperti ossei umani e di fauna a grandi mammiferi provenienti dai seguenti siti archeologici dell'Italia Centro-Meridionale: Palidoro, Grotta Maritza, Grotta La Punta, Grotta dell'Orso, Grotta dei Piccioni, Grotta Polesini, Grotta Paglicci e Riparo Vado all'Arancio.

Con questo metodo è stato possibile datare direttamente alcuni importanti frammenti di ossa umane del peso di pochi grammi (*Homo Maritza*, *Homo Marsicanus*, bambino della sepoltura Paglicci ecc.) che sarebbe stato impossibile datare con il ^{14}C a causa della notevole quantità di materiale osseo che quest'ultimo metodo richiede. In generale le età ottenute sono risultate

in buon accordo con le età ^{14}C ; la differenza maggiore è risultata del 18 %, la differenza media dell'8 %.

Viene descritto il procedimento di estrazione dell'acido aspartico dalle ossa fossili e sono riportate le condizioni relative alla reazione di sintesi dei dipeptidi diastereoisomeri L-Leu-D-Asp e L-Leu-L-Asp, necessaria per la misura del rapporto D/L. È indicata la procedura seguita per individuare i reperti ossei che sono stati esposti ad elevate temperature. Infine è stato controllato l'effetto di fattori ambientali come il pH, l'umidità e la lisciviazione sulla velocità di racemizzazione dell'acido aspartico in alcuni campioni di età ^{14}C minore di 12 000 anni.

INTRODUZIONE

Un nuovo metodo di datazione, basato sulla racemizzazione degli ammino acidi ed applicato con successo principalmente nello studio delle ossa fossili (BADA, 1972 b; BADA, KVENVOLDEN & PETERSON, 1973; BADA & MASTERS HELFMAN, 1975; BADA & PROTSCH, 1973; BADA, SCHROEDER & CARTER, 1974; BADA, SCHROEDER, PROTSCH & BERGER, 1974; TUREKIAN & BADA, 1972), è in fase di sperimentazione molto avanzata negli Stati Uniti ad opera soprattutto di Jeffrey L. BADA e collaboratori.

Questo metodo presenta un effettivo campo di indagine che va da poche migliaia di anni dal presente fino a diverse centinaia di migliaia di anni e può in tal modo realizzare un utilissimo aggancio fra le età carbonio 14 e argon-potassio, fornendo un importante strumento cronologico sia nel campo della paleoantropologia che in quello della geocronologia.

Il metodo si basa sullo studio degli ammino acidi che formano la frazione proteica di tutti gli organismi viventi e che, come è noto, sono principalmente L-enantiomeri prodotti dalla specifica azione stereochimica di enzimi.

(*) Centro di Studio per la Geocronologia e la Geochimica delle Formazioni Recenti del CNR, Istituto di Geochimica, Università di Roma. Questo lavoro è stato eseguito con il contributo finanziario del CNR.

È stato ampiamente dimostrato che in matrici liquide come le soluzioni fortemente acide (BADA & SCHROEDER, 1975), basiche (BADA & SCHROEDER, 1975) e, recentemente, anche neutre (BADA, 1971; BADA, 1972 a), gli ammino acidi subiscono a caldo una veloce racemizzazione cioè una reazione che converte una molecola otticamente attiva in un miscuglio otticamente inattivo.

In matrici inorganiche solide, come per esempio le ossa, le conchiglie ecc., gli ammino acidi di forma L subiscono, in lunghi periodi del tempo geologico, una lenta racemizzazione.

I materiali fossili contengono quindi entrambi gli enantiomeri L e D ed il rapporto D/L di ciascun ammino acido aumenta con l'età del fossile (BADA & PROTSCH, 1973; HARE & MITTERER, 1967).

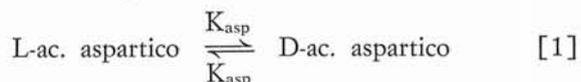
Dal momento che la reazione di racemizzazione ⁽¹⁾ è un processo chimico, la sua velocità è funzione della temperatura.

Essendo stato osservato che i fattori ambientali come il pH, l'umidità e la lisciviazione producono effetti generalmente trascurabili su questa reazione (BADA & MASTERS HELFMAN, 1975), le due maggiori variabili che influenzano l'estensione della racemizzazione in un fossile sono quindi il tempo e la temperatura. Tutti gli ammino acidi presentano perciò questo processo di conversione con una velocità che, a temperatura costante, è caratteristica dell'ammino acido in studio (BADA, SCHROEDER, PROTSCH & BERGER, 1974).

Fra i diversi ammino acidi del collagene, si è scelto l'acido aspartico in quanto è l'ammino acido più usato nella datazione delle ossa fossili (BADA & MASTERS HELFMAN, 1975).

È noto infatti che le misure del rapporto enantiomerico D/L di questo composto sono altamente riproducibili a causa della loro superiore precisione analitica (BADA & alii, 1979) e che l'acido aspartico possiede, alla temperatura dei siti investigati in questo lavoro e nell'intervallo di tempo databile con il carbonio 14, una delle più elevate velocità di racemizzazione fra gli ammino acidi del collagene (BADA, KVENVOLDEN & PETERSON, 1973).

La reazione di racemizzazione dell'acido aspartico può essere scritta in questo modo:



Dove K_{asp} è la costante cinetica del primo ordine relativa alla interconversione degli enantiomeri L e D. Il rapporto enantiomerico D/L è legato al tempo t dalla relazione:

$$\ln \left[\frac{1+D/L}{1-D/L} \right] - \ln \left[\frac{1+D/L}{1-D/L} \right]_{t=0} = 2 \cdot K_{\text{asp}} \cdot t \quad [2]$$

(BADA, 1972 b; BADA & SCHROEDER, 1972).

⁽¹⁾ Per gli ammino acidi con più di un centro di asimmetria (per es. isoleucina, treonina, idrossilisina e idrossiprolina) la reazione viene più propriamente chiamata epimerizzazione piuttosto che racemizzazione.

La costante di integrazione è diversa da zero poiché include sia la piccola quantità dell'enantiomero D presente inizialmente nel campione sia la esigua racemizzazione che si genera durante il procedimento usato nell'isolamento di questo ammino acido (BADA & PROTSCH, 1973; BADA & SCHROEDER, 1972; MANNING, 1970). L'equazione [2] può infine essere scritta:

$$\ln \left[\frac{1+D/L}{1-D/L} \right] - 0.14 = 2 \cdot K_{\text{asp}} \cdot t \quad [3]$$

Per datare quindi un osso fossile con questo metodo, è necessario valutare la temperatura media alla quale il materiale è stato esposto. Ciò rappresenta sfortunatamente una limitazione al metodo in quanto è fondamentale effettuare una indagine sulla storia della temperatura della regione dove il fossile è stato rinvenuto. Tuttavia, questa valutazione della temperatura può essere risolta usando un procedimento con il quale la velocità di racemizzazione dell'ammino acido in studio, per un particolare sito, viene calcolata misurandone l'estensione della racemizzazione in un osso datato con il metodo del carbonio 14 (BADA, SCHROEDER, PROTSCH & BERGER, 1974).

Una volta che per un determinato sito archeologico è stato effettuato questo procedimento, detto « calibrazione », la reazione di racemizzazione può essere usata per datare direttamente altre ossa fossili che provengono dalla stessa area e che sono o troppo vecchie (per esempio > 45 000 anni) oppure in quantità troppo scarsa per essere datate con il metodo del carbonio 14.

I valori di età ottenuti seguendo questa procedura sono risultati in stretto accordo con le età carbonio 14 (BADA, SCHROEDER & CARTER, 1974; BADA, SCHROEDER, PROTSCH & BERGER, 1974).

È opportuno sottolineare che la temperatura media che ha interessato il campione scelto per la « calibrazione » del sito deve essere rappresentativa della temperatura media che ha interessato gli altri campioni del deposito (BADA, SCHROEDER, PROTSCH & BERGER, 1974).

Studi sul rapporto isotopico dell'ossigeno (DANSGAARD, JOHNSEN, MOLLER & LANGWAY, 1969; EMILIANI, 1971) e sui diagrammi pollinici (HAMMEN, MAARLEVELD, VOGEL & ZAGWIJN, 1967) hanno indicato che sulla Terra si sono avute condizioni glaciali da circa 100 000 a circa 9 000 anni fa con un intervallo più caldo, tuttavia non così caldo come al presente, avvenuto fra i 50 000 e i 30 000 anni fa e con alcune delle temperature più fredde intorno ai 20 ÷ 18 000 anni fa (SHACKLETON & OPDYKE, 1973).

È stato osservato (BADA, SCHROEDER, PROTSCH & BERGER, 1974) che per la « calibrazione » di un sito, dovranno essere usati campioni postglaciali per datare reperti da questo evento ai tempi nostri mentre, per la datazione di materiali dell'ultima glaciazione, i campioni migliori sono risultati essere quelli aventi un'età compresa fra i 18 000 ÷ 20 000 anni.

Nelle aree climatiche dove le temperature medie attuali sono comprese fra i 15 °C e i 20 °C, la datazione basata sulla racemizzazione dell'acido aspartico presenta un effettivo campo di indagine che va da 100 000 a 5 000

anni circa, essendo questo intervallo dipendente soprattutto dalla temperatura del sito. Usando però nella tecnica della « calibrazione » altri ammino acidi quali la alanina e l'acido glutammico che, a 20 °C, racemizzano con velocità minori rispetto all'acido aspartico (BADA, 1971; BADA, 1972; BADA, KVENVOLDEN & PETERSON, 1973), sarebbe possibile estendere il limite di datazione al di là dei 250 000 anni.

Col presente lavoro abbiamo voluto tentare, nel nostro Laboratorio, l'applicazione di questa nuova tecnica alla datazione di materiale osseo fossile allo scopo di contribuire ad estendere le conoscenze nel campo della paleoantropologia.

Questo metodo infatti, oltre a presentare un campo di indagine più esteso di quello del carbonio 14, richiede per la datazione di un osso fossile una quantità di materiale assai esigua offrendo quindi la possibilità di datare direttamente anche i reperti umani più rari e preziosi.

I campioni studiati, costituiti da ossa umane e da ossa di fauna a grandi mammiferi, provengono dai seguenti siti archeologici dell'Italia Centro-Meridionale: deposito di Palidoro (ALESSIO & *alii*, 1976-1977; ALESSIO & *alii*, 1976), Grotta Maritza (RADMILLI, 1977), Grotta La Punta (FERRARA, FORNACE-RINALDI & TONGIORGI, 1961; RADMILLI, 1977), Grotta dell'Orso (CREMONESI, 1968; GRIFONI, 1967; ALESSIO & *alii*, 1973), Grotta Polesini (RADMILLI, 1974), Grotta Paglicci (AZZI, BIGLIOCCA & PIOVAN, 1974; PALMA DI CESNOLA, 1974; AZZI, BIGLIOCCA & GULISANO, 1977) e Riparo Vado all'Arancio (MINELLONO, 1972).

Allo scopo di controllare l'affidabilità delle date da noi ottenute con questa tecnica di datazione, abbiamo pensato di ricercare il valore del rapporto enantiomerico D/L dell'acido aspartico nelle ossa di alcuni livelli culturali in gran parte già datati con il metodo del carbonio 14.

È noto che la temperatura è il maggior fattore che influenza l'estensione della racemizzazione in un campione. Di conseguenza, prima di determinare il rapporto enantiomerico D/L nelle ossa fossili in studio sarà di fondamentale importanza accertare che queste non siano state esposte ad elevate temperature (BADA, SCHROEDER & CARTER, 1974); in caso contrario i campioni presenterebbero un alto grado di racemizzazione producendo risultati errati (BADA, SCHROEDER, PROTSCH & BERGER, 1974).

Anche se i parametri ambientali come il pH, l'umidità e la lisciviazione producono, in generale, effetti trascurabili sulla velocità di racemizzazione (BADA & MASTERS HELFMAN, 1975), sarà sempre opportuno, quando possibile, valutarne l'entità.

PROCEDURA SPERIMENTALE

METODI

Le ossa fossili vengono pulite meccanicamente allontanando i resti del tessuto poroso e della matrice terrosa attaccata alla superficie e nelle fessure e più volte accuratamente lavate in HCl 0,2 M con ultrasuoni per eli-

minare le ultime tracce di materia estranea aderente (BADA & PROTSCH, 1973).

Vengono poi essiccate sotto vuoto alla temperatura ambiente e macinate in mortaio; quindi una quantità di sostanza compresa fra i 5 e 10 g è posta in una fiala di vetro Pyrex del diametro di circa 3,5 cm, altezza di circa 12 cm e che può contenere al massimo 110 ml di soluzione. Si attacca il campione con un eccesso di HCl 6 M (circa 30 ml per 5 g di osso) e, subito dopo, si invia un flusso di azoto all'interno della fiala fino a completa solubilizzazione della fase carbonatica. La fiala viene quindi saldata e tenuta in bagno di sabbia per 24 h alla temperatura di 110 °C.

Completata l'idrolisi acida, la fiala viene portata a temperatura ambiente e quindi aperta; la soluzione cloridrica, filtrata su Gooch, viene trasferita in un palloncino da 250 ml e portata a secchezza in un evaporatore rotante a circa 50 °C sotto pressione ridotta.

Il residuo è ripreso con acqua bidistillata ed essiccato ripetendo l'operazione per tre volte per eliminare ogni traccia di HCl e viene infine disciolto in acqua bidistillata e desalificato mediante resina Dowex 50W-X8 (100 ÷ 200 mesh) ⁽²⁾.

Gli ammino acidi vengono eluiti dalla resina con NH₄OH 1,5 M, raccolti in un palloncino da 100 ml e concentrati con l'ausilio di un evaporatore rotante a 53 °C circa sotto pressione ridotta (BADA & PROTSCH, 1973).

Il miscuglio degli ammino acidi, ripreso con acqua bidistillata e portato a secchezza per due volte allo scopo di allontanare ogni traccia di ammoniaca, viene solubilizzato in 5 ml di CH₃COOH 1,0 M e, prima di inviarlo nella resina AG 1-X8 (200 ÷ 400 mesh) ⁽³⁾ allo scopo di separare l'acido aspartico, una aliquota di soluzione viene sottoposta all'analizzatore di ammino acidi per controllare se il reperto in studio è stato esposto ad elevate temperature ⁽⁴⁾. La frazione di acido aspartico, raccolta con un collettore di frazioni automatico ⁽⁵⁾, viene evaporata a secchezza in un evaporatore rotante a 40 °C circa sotto pressione ridotta.

⁽²⁾ In generale, per la desalificazione degli ammino acidi ottenuti sottoponendo ad analisi 5 ÷ 10 g di materia ossea, si usa un letto di resina Dowex 50W-X8 (della Bio-Rad, Dow Chemical Co., Richmond Calif.) di circa 20 mm x 300 mm (BADA, comunicazione personale).

Per la sua rigenerazione, si eluisce la colonna dapprima con 250 ml di NaOH M e poi con 200 ml di HCl 2M lavando la resina, dopo ciascun trattamento, con acqua distillata fino alla neutralità dell'eluato.

⁽³⁾ Viene usata una colonna con un letto di resina (AG1-X8 della Bio-Rad, nella forma cloridrica) di circa 20 mm x 160 mm e la si eluisce con CH₃COOH 1,0 M. Si « calibra » la colonna con un miscuglio di glicina, ac. glutammico ed ac. aspartico. La frazione nella quale l'ac. aspartico eluisce viene in tal modo determinata; questa frazione viene dunque raccolta quando il miscuglio degli ammino acidi isolato dall'osso fossile è fatto passare attraverso la colonna. La resina viene rigenerata dopo ogni estrazione, eluendola prima con 100 ml di CH₃COONa 1 M e poi con circa 100 ml di CH₃COOH 1 M (BADA, comunicazione personale).

⁽⁴⁾ Le ossa bruciate risultano quasi completamente prive dei due ammino acidi serina e treonina (BADA, comunicazione privata) (BADA, SCHROEDER & CARTER, 1974).

⁽⁵⁾ Fraction Collector, Mod. 1320 della BIO-RAD.

Il residuo viene solubilizzato in 2,0 ml di acqua bi-distillata ed una piccola porzione di esso (circa $0,05 \div 0,2$ ml) è introdotta nell'analizzatore allo scopo di determinare la quantità di acido aspartico isolato e di controllare la purezza della frazione (BADA, comunicazione personale).

Dopo aver fatto ciò, l'acqua è evaporata in un essiccatore da vuoto su NaOH.

Il rapporto enantiomerico D/L dell'acido aspartico viene determinato preparando i dipeptidi diastereoisomeri secondo la procedura descritta da MANNING & MOORE (1968) e da BADA (comunicazione personale) in questo modo: una quantità di residuo pari a circa 20 μ moli viene pesata in un piccolo tubo da saggio e sciolta in circa 2 \div 3 ml di tampone borico a pH = 10,2 (corrispondente a pH = 10,4 a 0 °C).

La soluzione viene quindi portata alla temperatura di 2 \div 4 °C in un bagno a ghiaccio.

Una piccola quantità di L-leucil-NCA⁽⁶⁾ (in eccesso molare intorno al 15 %) viene aggiunta alla soluzione di acido aspartico con una spatola di acciaio inossidabile ed il miscuglio è agitato vigorosamente (Vortex stirrer) per tre minuti con la spatola mantenuta nel tubo di saggio.

Vengono quindi aggiunte rapidamente diverse gocce di HCl 6M portando il pH intorno a 2. Infine il miscuglio viene filtrato attraverso lana di vetro ed una aliquota di soluzione, perfettamente limpida, è inviata all'analizzatore per determinare il rapporto D/L.

È stato usato un analizzatore automatico di amminoacidi Carlo Erba mod. 3A28; le misure di pH sono state effettuate con uno Standard pH-metro PHM 62 della RADIOMETER (Copenhagen); i reagenti chimici usati sono ARISTAR della BDH.

Le età carbonio 14 dei reperti sono state determinate presso il Laboratorio Carbonio 14 dell'Università di Roma ed il collagene⁽⁷⁾ è stato ottenuto con il metodo descritto da OLSSON & alii (1974).

RISULTATI

È stato determinato il rapporto enantiomerico D/L dell'acido aspartico in alcune ossa prelevate in parti diverse di uno scheletro di bovino moderno sottoponendo questi campioni allo stesso trattamento usato per le ossa fossili; i valori ottenuti sono risultati compresi fra 0,069

⁽⁶⁾ La L-leucil-N-carbossianidride (L-leu-NCA) è stata sintetizzata e gentilmente offerta dal Dott. Renzo Boni della ASSORENI (Associazione Ricerca ENI) di Monterotondo, Roma.

⁽⁷⁾ La datazione delle ossa fossili con il metodo del carbonio 14 deve essere effettuata sulla parte proteica del campione in quanto è noto che l'età della frazione carbonatica spesso discorda da quella proteica a causa dei processi di scambio provocati dalle acque sotterranee carbonatiche a differente attività specifica (BADA, SCHROEDER, PROTSCH & BERGER, 1974).

In media, le ossa contengono il 50 % di idrossifosfato di calcio (apatite), il 10 % di carbonato di calcio, il 25 % di collagene ed il 5 \div 10 % di grasso di osso. Il resto è principalmente costituito da mucosaccaridi, fluoruro di calcio, fosfato di magnesio, sali di sodio ed elementi pesanti come il ferro ed il manganese (BERGER, 1975).

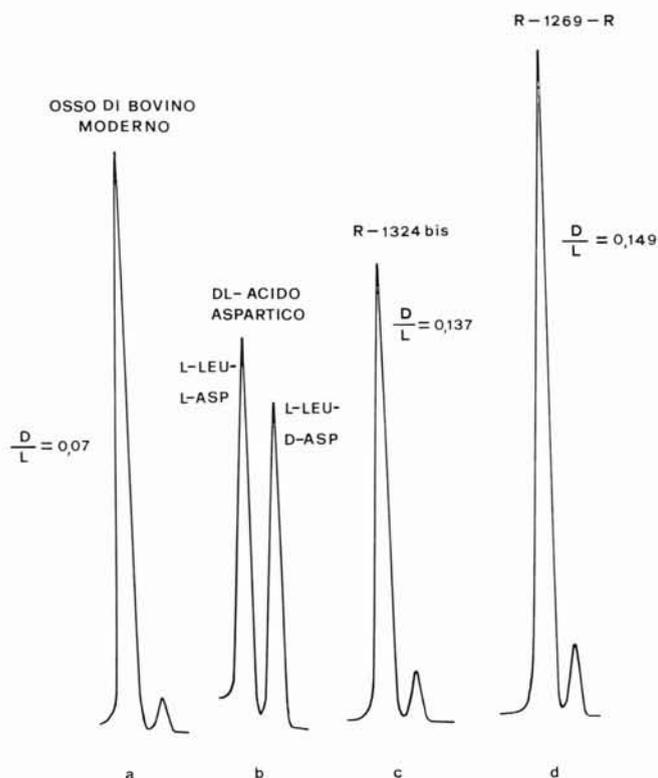


Fig. 1 - Parte di alcuni spettri eseguiti con un analizzatore automatico di amminoacidi che mostrano i dipeptidi diastereoisomeri L-leu-D-asp e L-leu-L-asp. Per la separazione delle due forme è usata una resina della CARLOERBA STRUMENTAZIONE tipo 3AR/9/A/20, nella forma ionica Na⁺. La colonna viene eluita con un tampone a pH = 3,33 per 24 min., quindi con un tampone a pH = 3,65 per il resto della corsa alle temperature, rispettivamente, di 50 °C e 65 °C. Il flusso del tampone e della ninidrina è 50ml/h. L'ac. aspartico, L-leu-D-asp, L-leu-L-asp e la leucina escono a 33, 72, 75 e 83 min. seguendo quest'ordine di eluizione.

e 0,074. Il valore medio, risultato uguale a 0,073 (tab. 1 e fig. 1a), è quasi uguale a quello ottenuto da BADA & MASTERS HELFMAN (1975).

Abbiamo inoltre considerato utile controllare il valore della estensione della reazione di racemizzazione dell'acido aspartico in due distinte parti di un femore di *Bos primigenius* che non erano state esposte ad elevate temperature. I valori dei rapporti enantiomerici sono risultati identici (tab. 1).

Ciò è in accordo con il fatto che il rapporto enantiomerico relativo a ciascun amminoacido stabile, deve essere uguale in ogni parte del tessuto osseo di un organismo.

La fig. 1b mostra parte dello spettro, usato come standard⁽⁸⁾, dei dipeptidi diastereoisomeri L-leu-D-asp e L-leu-L-asp ottenuti dalla reazione fra la L-leucil-NCA ed una miscela racemica di acido DL-aspartico.

⁽⁸⁾ Gli standards sono stati preparati utilizzando una miscela racemica di ac. DL-aspartico della CALBIOCHEM, San Diego, California.

TABELLA 1
CONFRONTO TRA LE ETÀ OTTENUTE CON I METODI DEL CARBONIO 14 E DELLA RACEMIZZAZIONE DELL'ACIDO ASPARTICO.

Sito archeologico	Laboratorio C-14 e sigla campione		Quantità (in g) di osso fossile usata per calcolare l'età ac. asp ⁽¹⁾ C14 ⁽²⁾		Rapporto D:L ac. aspar.		Età ac. aspart. ⁽³⁾ anni (B.P.)	Età carbonio-14 su collagene
PALIDORO	R-944	strato 1	<i>Cervus elaphus</i>	5,0	620	0,112	$K=2,91 \times 10^{-6} \text{Yr}^{-1}$	14 580±130 ⁽⁴⁾
	R-946	" 5	<i>Cervus elaphus</i>	5,0	1 310	0,115	15 650	15 340±140
	R-947	" 6	<i>Bos primigenius</i>	5,3	600	0,117	16 350	15 660±130
	R-948	" 7	<i>Equus caballus</i>	5,5	1 000	0,113	15 000	15 900±150
GR. MARITZA	R-1271	" 30-31	<i>Cervus elaphus</i>	6,0	383	0,119	$K=4,76 \times 10^{-6} \text{Yr}^{-1}$	10 420±150 ⁽⁴⁾
	R-1271-R	" 31	mandibola uomo (<i>Homo maritza</i>)	5,0		0,120	10 600	
	R-1270-R	" 37-39	costola bambino	7,0	257	0,124	11 500	10 420±60
GR. LA PUNTA	Pi-153	" 24-25						10 581±100 ⁽⁵⁾
	R-1272	" 27-31	<i>Cervus elaphus</i>	5,1	203	0,122	$K=4,47 \times 10^{-6} \text{Yr}^{-1}$	11 770±70
	R-1272-R	" 34	omero di uomo (<i>Homo marsicanus</i>)	5,2		0,126	12 700	
	Pi-152	" 39-40						14 488±800 ⁽⁵⁾
GR. PICCIONI	R-1273	"	<i>Cervus elaphus</i>	5,0	164	0,082	$K=2,37 \times 10^{-6} \text{Yr}^{-1}$	5 140±50 ⁽⁴⁾
	R-1273-R	"	Tomba parete ossa di bambino Tomba parete	5,1		0,084	6 000	
	Pi-46	"						6 247±130 ⁽⁵⁾
GR. DELL'ORSO	R-1274	" 8-9	<i>Cervus elaphus</i>	6,5	360	0,103	$K=5,30 \times 10^{-6} \text{Yr}^{-1}$	6 290±60 ⁽⁴⁾
	R-1274-R	" 8-9	cranio di uomo	6,5		0,107	7 000	
	R-676	" 8-9						6 080±50 ⁽⁵⁾
GR. POLESINI	R-1265	" 7	<i>Cervus elaphus</i>	5,0	168	0,122	$K=5,21 \times 10^{-6} \text{Yr}^{-1}$	10 090±80 ⁽⁴⁾
	R-1265-R	" 7	femore di uomo	5,5		0,123	10 300	
GR. PAGLICCI	R-1334-R	" 9	costola di uomo	5,0		0,133	16 150	15 270±220 ⁽⁵⁾
	R-1323	" 10E ₁	<i>Cervus elaphus</i>	6,6		0,163	23 900	15 320±250 ⁽⁵⁾
	R-1324bis	" 18b ₂	<i>Cervus elaphus</i>	10,0	800	0,137	$K=3,95 \times 10^{-6} \text{Yr}^{-1}$	17 200±150 ⁽⁴⁾
	R-1269bis	" 21c	<i>Bos primigenius</i>	9,3		0,159	22 900	24 210±410 ⁽⁶⁾
	R-1269-R	" 21d	costola bambino Sepoltura	6,0		0,149	20 300	24 720±420 ⁽⁶⁾
RIPARO VADO	R-1333	" 11	<i>Bos primigenius</i>	7,0	362	0,102	$K=2,86 \times 10^{-6} \text{Yr}^{-1}$	11 330±50 ⁽⁴⁾
ALL'ARANCIO	R-1333-R	" 11	costola di uomo Sepoltura	6,1		0,108	13 400	
	R-A	"	osso di bovino moderno	5,3		0,073 ⁽⁶⁾		
	R-B ⁽⁷⁾	"	testa di femore	5,0		0,085		
	R-B'	"	epifisi inferiore	4,7		0,085		

- (1) Frammento di osso idrolizzato in HCl 6M. In generale, soltanto una piccola parte dell'ac. aspartico isolato viene usata per la determinazione del rapporto enantiomerico.
- (2) Le ossa usate erano di fauna a grandi Mammiferi, principalmente *Cervus elaphus*, *Bos primigenius*, *Equus caballus*, *Equus hydruntinus*, *Sus scrofa*, ecc.
- (3) Le età e le costanti K_{asp} sono state calcolate utilizzando l'equazione [3]. L'errore sui valori dei rapporti D/L, misurati sperimentalmente su campioni noti, oscilla intorno al 2% (BADA & PROTSCH, 1973). In generale, ne consegue un errore relativo sulla data del 3-5%.
- (4) Campione usato per la « calibrazione » del sito.
- (5) Età radiocarbonio effettuata su ossa carbonizzate o su altro materiale organico associato.
- (6) Media di diverse analisi.
- (7) Campioni prelevati in due distinte parti di un femore di *Bos primigenius*.

Come è possibile osservare la resa alla ninidrina del dipeptide D-L è più bassa che per il dipeptide L-L (MANNING & MOORE, 1968).

Per ottenere, quindi, il reale rapporto dell'acido aspartico in un campione, si deve moltiplicare il rapporto misurato per un fattore di conversione; questo fattore, de-

terminato per il nostro analizzatore automatico, è risultato 1,32.

Allo scopo di controllare la purezza della frazione dell'acido aspartico, isolato dal miscuglio totale degli amminoacidi delle ossa, abbiamo sottoposto all'analizzatore l'aspartico di numerosi campioni. Come risulta dal-



FIG. 2 - Spettri dei campioni R-1272 e R-1273 eseguiti sulla frazione di acido aspartico (vedi testo).

la fig. 2, nella quale sono riportati gli spettri dei campioni R-1272 e R-1273, si ottiene un prodotto di rilevante purezza.

La sequenza della Grotta Paglicci, già datata con il metodo del carbonio 14 (AZZI, BIGLIOCCA & PIOVAN, 1974; AZZI, BIGLIOCCA & GULISANO, 1977), comprende diverse sezioni stratigrafiche, la più antica delle quali è attribuibile al Gravettiano Evoluto con punte de « La Font Robert », mentre le formazioni più giovani sono riferibili all'Epigravettiano Finale (PALMA DI CESNOLA, 1974).

Per la « calibrazione » del sito, sono state usate ossa di fauna dello strato 18 b2 sia per la determinazione del rapporto enantiomerico D/L (fig. 1c) che per l'analisi al carbonio 14, che ha dato un'età di $17\,200 \pm 150$ (v. tab. 1, R-1324 bis). Questo valore concorda abbastanza bene con la media dei tre valori ottenuti da AZZI & alii (1974) per lo stesso orizzonte stratigrafico.

Eseguita la « calibrazione » del sito, è stato possibile datare con la racemizzazione (tab. 1) un frammento di costola di uomo dello strato 9 (R-1334-R), una scheggia di *Cervus elaphus* dello strato 10E₁ (R-1323), un pezzo di femore di *Bos primigenius* dello strato 21 c (R-1269 bis) ed alcuni frammenti di costola di bambino dello strato 21 d (R-1269-R) appartenenti ad una sepoltura.

Quest'ultima data (20 300) è la prima diretta indicazione della età di questo importante scheletro di fanciullo. Si fa notare che l'età carbonio 14, eseguita su

materiale carbonioso associato e quindi indiretta, risulta di $24\,720 \pm 420$.

Sempre dall'osservazione della tab. 1, si riscontra una notevole differenza di età per il campione R-1323 datato $15\,320 \pm 250$ con il carbonio 14 e $23\,900$ con la racemizzazione. Dal momento che l'osso fossile, sul quale è stato ricercato il rapporto D/L, non è risultato essere stato esposto ad elevate temperature, appare legittimo sospettare che questo reperto sia stato erroneamente attribuito allo strato 10E₁ mentre, in realtà, sia appartenuto ad uno strato più profondo (per esempio il 21).

Per quanto riguarda lo strato 21 c di questa grotta era stato scelto in un primo tempo un osso, contrassegnato dalla sigla R-1269 (tab. 2) che, osservato al microscopio, non appariva essere stato esposto ad elevate temperature. Il valore del rapporto enantiomerico (0,342) calcolato per questo fossile, gli attribuiva l'irreale età di 72 500 anni mentre questo livello risultava avere un'età carbonio 14 di $24\,210 \pm 410$ anni (tab. 2).

Un'ispezione più accurata eseguita con l'analizzatore sul miscuglio degli ammino acidi mostrava uno spettro quasi completamente privo di serina e treonina rispetto all'acido aspartico (fig. 3a).

Ciò significa che il reperto è stato esposto ad elevate temperature (BADA, comunicazione personale; BADA, SCHROEDER & CARTER, 1974).

È noto invece (HARRINGTON & VON HIPPEL, 1961; GROSS, 1963; CANTALUPPI, 1975), che questi tre ammino acidi sono contenuti nel collagene di un osso non bruciato, sia fossile che moderno, generalmente nella seguente quantità: acido aspartico $4,4 \div 5,0$, serina $2,7 \div 3,8$ e treonina $1,6 \div 2,0$ mol % (fig. 3b).

Sfortunatamente anche per la « calibrazione » del sito fu scelto per primo un frammento di osso fossile (tab. 2, R-1324) che, in seguito, l'analisi mostrò essere un reperto bruciato. Tuttavia è interessante osservare, sempre in tab. 2, l'effetto prodotto dalla temperatura sulla reazione di racemizzazione del campione R-1324 il quale mostra un valore del rapporto enantiomerico, relativo all'acido aspartico, più del doppio superiore al rapporto trovato per il campione R-1324 bis, dello stesso livello, usato poi per la « calibrazione » del sito.

La costante di « calibrazione » del deposito di Pali-

TABELLA 2
CONFRONTO TRA LE ETÀ DI ALCUNE OSSA FOSSILI, OTTENUTE CON I DUE METODI,
RISULTATE ESPOSTE AD ELEVATE TEMPERATURE.

Sito archeologico	Sigla campione	D/L ac. aspartico	Età ac. aspartico	Età carbonio-14
PALIDORO	R-944	0,112	$K=2,91 \times 10^{-6} \text{Yr}^{-1}$	$14\,580 \pm 130^{(1)}$
	R-1240	0,222	53 500	$13\,710 \pm 130$
	R-945	0,219	52 500	$15\,310 \pm 160$
GROTTA PAGLICCI	R-1324bis	0,137	$K=3,95 \times 10^{-6} \text{Yr}^{-1}$	$17\,200 \pm 150^{(1)}$
	R-1324	0,299	60 500	$17\,200 \pm 150$
	R-1269	0,342	72 500	$24\,210 \pm 410$

(1) Campione usato per la « calibrazione » del sito (tab. 1).

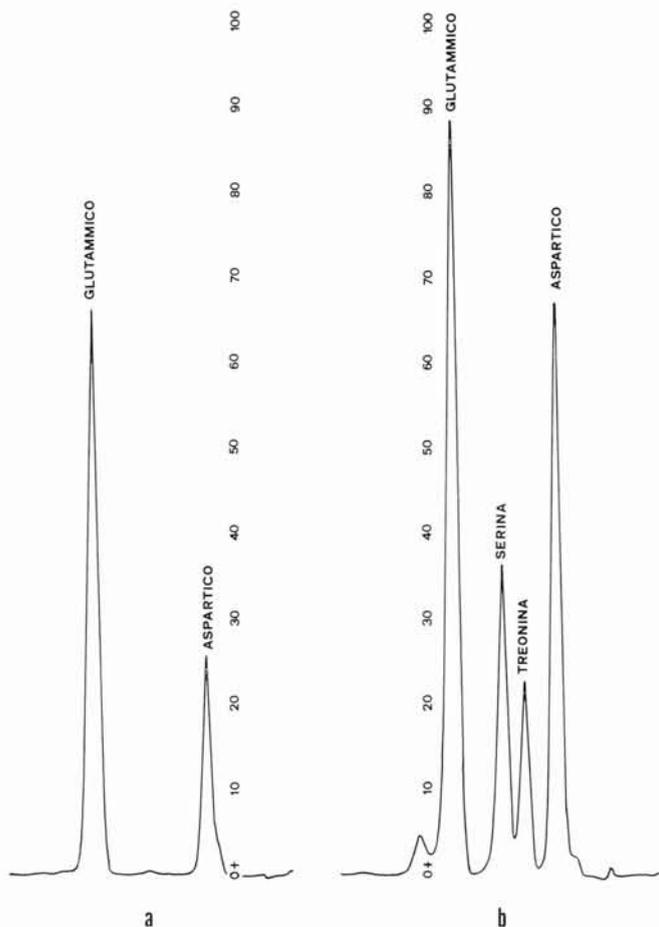


FIG. 3 - Parte di spettri ottenuti per un campione esposto (a) e un campione non esposto (b) ad elevate temperature.

doro è stata calcolata utilizzando l'età carbonio 14 del campione R-944 relativo allo strato 1 (tab. 1).

Anche in questo deposito del Paleolitico Superiore (ALESSIO & *alii*, 1976-1977; ALESSIO & *alii*, 1976), del quale abbiamo ottenuto risultati molto buoni analizzando ossa di fauna, si era osservato in un primo tempo che alcuni campioni risultavano avere età irrealisticamente alte (diverse decine di migliaia di anni) (tab. 2). In seguito però, mentre per alcuni di questi reperti è stata sufficiente un'ispezione più accurata al microscopio che ha rivelato tracce di carbone indicando così che le ossa erano state bruciate, per altri è stato invece necessario eseguire le analisi di controllo con l'analizzatore automatico sul miscuglio dei loro ammino acidi.

Anche in questo caso gli spettri hanno indicato che i campioni erano stati esposti ad elevate temperature in quanto risultavano quasi completamente privi di serina e treonina.

Per quanto riguarda la Grotta Maritza (tab. 1), effettuata la « calibrazione » del sito su ossa di fauna dello strato 30-31, è stato possibile datare con la racemizzazione un frammento di mandibola di uomo (R-1271-R; *Homo Maritza* secondo RADMILLI, 1977) proveniente

dallo stesso livello ed una costola di bambino trovata negli strati 37-39 (R-1270-R).

Ci sembra opportuno sottolineare che sebbene le età ottenute con i due metodi siano le uniche date di cronologia assoluta esistenti per questo sito archeologico, questi valori sono in discreto accordo con l'età attribuita alle culture degli orizzonti stratigrafici studiati (RADMILLI, 1977).

La Grotta La Punta (tab. 1) è stata « calibrata » utilizzando ossa di fauna dello strato 27-31 (R-1272).

Un frammento di omero di uomo del livello 34 (R-1272-R; *Homo Marsicanus* secondo RADMILLI, 1977) è stato datato con il metodo della racemizzazione e l'età è risultata di 12 700 anni. Si può vedere in tab. 1 che questo valore si inserisce bene fra le date carbonio 14 della sequenza stratigrafica del sito, anche se non si dispone di una data carbonio 14 relativa allo stesso orizzonte culturale.

È interessante osservare inoltre, sempre in tab. 1, che le Grotte Maritza e La Punta che sono situate a 200 m l'una dall'altra e alla stessa altitudine (circa 700 m s.m.), presentano valori delle costanti K_{asp} leggermente differenti. Probabilmente le due grotte sono state interessate da temperature lievemente differenti a causa della diversa orientazione e dimensione delle loro aperture (RADMILLI, 1977).

Infine sono state datate alcune ossa umane e di fauna delle grotte dei Piccioni, dell'Orso, Polesini e del Riparo Vado all'Arancio. I risultati della tab. 1 mostrano che c'è un discreto accordo tra le età carbonio 14, eseguite nel nostro Laboratorio oppure riprese dalla letteratura (FERRARA, FORNACE-RINALDI & TONGIORGI, 1961; ALESSIO & *alii*, 1973) e quelle ottenute mediante racemizzazione dell'acido aspartico.

Altri fattori, oltre alla temperatura, quali il pH, l'umidità e la lisciviazione potrebbero avere un certo effetto su tale velocità ed è importante quindi, quando ciò è possibile, valutarne il contributo (BADA & MASTERS HELFMAN, 1975).

A tale scopo abbiamo calcolato (tab. 3), per alcuni campioni di età carbonio 14 minori di 12 000 anni, la temperatura media che li ha interessati da quando sono stati depositi. I valori ottenuti sono stati quindi confrontati con le temperature medie annue dell'aria prese in stazioni termometriche appositamente scelte fra quelle a disposizione (MINISTERO DEI LAVORI PUBBLICI, 1966).

Poiché le due serie di temperature non hanno mostrato grandi differenze, è lecito concludere, almeno per quanto riguarda questi pochi reperti, che il contributo degli altri parametri ambientali come il pH, l'umidità e la lisciviazione sia stato esiguo.

Per quanto riguarda le piccole differenze, riscontrate per i campioni R-1273, R-1274 e R-1265 (tab. 3), è difficile stabilire con certezza quanto queste ultime siano da attribuire all'effetto dei parametri ambientali (pH, umidità e lisciviazione) o piuttosto all'incertezza nella valutazione delle temperature attuali dell'aria, tuttavia concordiamo con quanto detto da BADA & MASTERS HELFMAN (1975), che:

TABELLA 3

TEMPERATURE CALCOLATE PER ALCUNI SITI DELL'ITALIA CENTRALE IN OSSA DATATE CON IL CARBONIO 14 USANDO L'ESTENSIONE DELLA RACEMIZZAZIONE DELL'ACIDO ASPARTICO.

Sito archeologico	Età Carbonio-14 ⁽¹⁾ (anni B.P.)	D/L ac. aspartico	K _{asp} (Yr ⁻¹)	Temp. calc. ⁽²⁾ relative a Olduvai Gorge	Temp. aria ⁽³⁾ attuale me- dia annua
Olduvai Gorge Tanzania	LJ 2979 1 390±40	0,165	7,0x10 ⁻⁵	-----	23°C
Grotta Maritza Abruzzo 41° 57' N 13° 39' E ca. 700 m s.m.	R-1271 10 420±150	0,119	4,76x10 ⁻⁶	10°C	10-11°C
Grotta La Punta Abruzzo 200 m dalla Grotta Maritza ca.700m s.m.	R-1272 11 770±70	0,122	4,47x10 ⁻⁶	9,5°C	10-11°C
Grotta Piccioni Abruzzo 42° 13' N 13° 58' E ca. 400 m s.m.	R-1273 5 140±50 (5 900±60)	0,082	2,37x10 ⁻⁶	6,5°C	10°C
Grotta dell'Orso Toscana 42° 59' 25" N 11° 52' 08" E ca. 500 m s.m.	R-1274 6 290±60 (7 165±75)	0,103	5,30x10 ⁻⁶	10°C	13°C
Grotta Polesini Lazio 41° 57' 30" N 12° 43' 58" E ca. 60 m s.m.	R-1265 10 090±80	0,122	5,21x10 ⁻⁶	10°C	14-15°C

(1) In parentesi sono riportate le date corrette secondo le tabelle MASCA; utilizzando queste date, i valori delle temperature medie calcolate non vengono modificate.

(2) Temperature (in °K) calcolate con l'equazione: $\ln(K''_{asp}/K'_{asp}) = \frac{E_a}{1,987} - \frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2}$, dove $E_a = 33,4$ Kcal. mole⁻¹. Questi valori sono stati calcolati prendendo come riferimento la temperatura di 23 °C dell'Olduvai Gorge (BADA & MASTERS HELFMAN, 1975).

(3) I valori dei siti italiani sono stati ottenuti mediando temperature di stazioni termometriche opportunamente scelte (MINISTERO LAVORI PUBBLICI, 1966).

1) i dati relativi alle temperature attuali si riferiscono ad intervalli di tempo al massimo di qualche decennio e quindi rappresentano, il più delle volte, meno dello 0,5 % dell'intervallo di tempo che ha interessato il reperto;

2) queste temperature sono state prese in stazioni termometriche che, per quanto appositamente scelte, non riproducono esattamente quelle dei siti archeologici studiati, ed infine

3) le temperature dell'aria danno soltanto una stima approssimata della temperatura del suolo nel quale si trova il campione.

CONCLUSIONI

Nella tab. 1 sono state messe a confronto un certo numero di datazioni di ossa fossili umane, di fauna a grandi mammiferi e di altro materiale organico, provenienti da alcuni siti archeologici dell'Italia Centro-Meridionale, ottenute con i metodi del carbonio 14 e della racemizzazione dell'acido aspartico.

I risultati di questo primo studio sono da ritenersi senz'altro incoraggianti dal momento che i valori di età mostrano che c'è in generale un buon accordo tra le età dedotte con i due metodi; infatti la differenza maggiore è risultata del 18 %, la differenza media è dell'8 %.

È stato scelto materiale osseo di fauna per la « calibrazione » dei vari siti e con questa procedura è stato possibile datare direttamente, per la prima volta in Italia, diversi frammenti di ossa umane di adulto e di bambino del peso di pochi grammi come, per esempio, l'*Homo Maritza*, l'*Homo Marsicanus*, il bambino della sepoltura Paglicci ecc. che sarebbe stato impossibile datare con il carbonio 14 a causa della notevole quantità di materiale osseo che quest'ultimo metodo richiede.

Abbiamo inoltre confermato che un notevole impoverimento della serina e treonina rispetto all'acido aspartico nel miscuglio di amminoacidi estratto da un osso fossile indica che il campione è stato esposto ad elevate temperature.

Sono state calcolate infine le temperature medie che hanno interessato alcuni campioni, di età carbonio 14 minori di 12 000 anni, nell'intervallo di tempo intercorso da quando sono stati depositi.

I risultati ottenuti, confrontati con le temperature medie annue attuali dell'aria relative alle zone interessate, dimostrano che l'influenza di altri fattori ambientali come il pH, l'umidità e la lisciviazione sulla velocità di racemizzazione è, in generale, limitata.

Dai risultati ottenuti appare evidente l'interesse che il metodo di datazione basato sulla racemizzazione degli amminoacidi presenta nello studio della preistoria italiana dove numerosi sono i problemi che attendono di essere risolti.

Questa tecnica infatti, anche se non offre attualmente l'accuratezza del metodo del carbonio 14, presenta tuttavia alcuni innegabili vantaggi:

1) utilizza una quantità di sostanza ossea compresa generalmente fra 1/50 e 1/100 di quella richiesta per una datazione carbonio 14 permettendo quindi una datazione diretta,

2) impiega per le analisi un tempo minore ed infine

3) presenta un campo di indagine assai più esteso (circa 100 000 anni).

RINGRAZIAMENTI

Siamo grati alle seguenti persone per aver generosamente fornito i campioni di ossa usati in questo studio: prof. A. M. RADMILLI e prof. C. TOZZI dell'Istituto di Antropologia e Paleontologia Umana dell'Università degli Studi di Pisa, prof. A. PALMA DI CESNOLA e prof. G. GAMBASSINI dell'Istituto di Antropologia e Paleontologia Umana della Università di Siena. Ringraziamo il prof. E. CERNIA che ha consentito l'impiego di alcune attrezzature esistenti presso il Laboratorio di ricerca ASSORENI (Monte Rotondo-Roma) da lui diretto ed il dott. P. BACCHIN, il dott. R. BONI ed i tecnici R. RICHICHI, V. MIGNINI, F. CARDINALI e E. DE GREGORIS del Laboratorio di Ricerca ASSORENI (Monte Rotondo-Roma) per le analisi dei rapporti enantiomerici. Ringraziamo inoltre la prof. D. BORRA dell'Istituto di Chimica Biologica e il prof. C. TROGOLO dell'Istituto di Chimica Organica dell'Università di Roma per il prezioso aiuto fornito in questo lavoro, e lo staff del Laboratorio Carbonio 14 degli istituti di Fisica e di Geochimica dell'Università di Roma per la determinazione delle date. Un particolare ringraziamento va infine al dott. J. L. BADA, alla dott. P. MASTERS HELFMAN dello Scripps Institution of Oceanography, La Jolla, California per gli utilissimi suggerimenti forniti nel corso della messa a punto di questa tecnica di datazione e al prof. M. FURNASERI dell'Istituto di Geochimica dell'Università di Roma, per la lettura critica del manoscritto.

BIBLIOGRAFIA

- ALESSIO M. & alii (1976-1977) - *Carbon-14 dating of bone collagen from upper Paleolithic Palidoro deposit*. Quaternaria, 19, 181-186.
- ALESSIO M. & alii (1973) - Radiocarbon, 15, 165-178.
- ALESSIO M. & alii (1976) - Radiocarbon, 18, 321-349.
- AZZI C. M., BIGLIOCCA L. & GULISANO F. (1977) - Radiocarbon, 19, 165-169.
- AZZI C. M., BIGLIOCCA L. & PIOVAN E. (1974) - Radiocarbon, 16, 10-14.
- BADA J. L. (1971) - *Kinetics of the nonbiological decomposition and racemization of amino acids in natural waters*. In « Nonequilibrium Systems in Natural Water Chemistry, Advances in Chemistry Series, 106, pp. 309-331. American Chemical Society, Washington, D.C. ».
- BADA J. L. (1972 a) - *Kinetics of racemization of amino-acid as a function of pH*. Journ. Am. Chem. Soc., 95, 1371-1373.
- BADA J. L. (1972 b) - *The dating of fossil bones using the racemization of isoleucine*. Earth Plan. Sc. Lett., 15, 223-231.
- BADA J. L. & alii (1979) - *Amino acid racemization dating of fossil bones, I. Inter-laboratory comparison of racemization measurements*. Earth Plan. Sc. Lett., 43, 265-268.
- BADA J. L., KVENVOLDEN K. A. & PETERSON E. (1973) - *Racemization of amino acids in bones*. Nature, 245, 308-310.
- BADA J. L. & MASTERS HELFMAN P. (1975) - *Amino acid racemization dating of fossil bones*. World Arch., 7, 160-173.
- BADA J. L. & PROTSCH R. (1973) - *Racemization reaction of aspartic acid and its use in dating bones*. Proc. Nat. Acad. Sc. USA, 70, 1331-1334.
- BADA J. L. & SCHROEDER R. A. (1972) - *Racemization of isoleucine in calcareous marine sediments: kinetics and mechanism*. Earth Plan. Sc. Lett., 15, 1-11.
- BADA J. L. & SCHROEDER R. A. (1975) - *Amino acid racemization reactions and their geochemical implications*. Naturwiss., 62, 71-79.
- BADA J. L., SCHROEDER R. A. & CARTER G. F. (1974) - *New evidence for the antiquity of man in North America deduced from aspartic acid racemization*. Science, 184, 791-793.
- BADA J. L., SCHROEDER R. A., PROTSCH R. & BERGER R. (1974) - *Concordance of collagen-based radiocarbon and aspartic acid racemization ages*. Proc. Nat. Acad. Sc. USA, 71, 914-917.
- BERGER R. (1975) - *Advances and results in radiocarbon dating: early man in America*. World Arch., 7, 174-184.
- CANTALUPPI G. (1975) - *Il collagene nei Vertebrati fossili: studio applicativo sui Bovidi quaternari pavesi*. Boll. Soc. Pal. It., 14, 55-64.
- CREMONESI G. (1968) - *La Grotta dell'Orso di Sarteano*. Origini, 2, 247-331.
- DANSGAARD W., JOHNSEN S. J., MOLLER J. & LANGWAY C. C. (1969) - *One thousand centuries of climatic record from camp century on the Greenland ice sheet*. Science, 166, 377-381.
- EMILIANI C. (1971) - *The last interglacial: paleotemperatures and chronology*. Science, 171, 571-573.
- FERRARA G., FORNACE-RINALDI G. & TONGIORGI E. (1961) - Radiocarbon, 3, 99-104.
- GRIFONI R. (1967) - *La Grotta dell'Orso di Sarteano. Il Neolitico*. Origini, 1, 53-115.
- GROSS J. (1963) - *Comparative biochemistry of collagen*. In « FLORKIN M. & MASON H. S., Comparative Biochemistry: Acad. Press, 5, 307-346, London ».
- HAMMEN T. v. d., MAARLEVELD G. C., VOGEL J. C. & ZAGWIJN W. H. (1967) - *Stratigraphy, climatic succession and radiocarbon dating of the last glacial in the Netherlands*. Geol. Mijnbouw, 46, 79-95.
- HARE P. E. & MITTERER R. M. (1967) - *Non-protein amino acids in fossil shells*. Carnegie Inst. Washington Yearbook, 65, 362-364.
- HARRINGTON W. F. & HIPPEL P. H. VON (1961) - *Structure of collagen and gelatin*. In « ANFINSEN, C. B. & alii. Edts, Acad. Press. Advan. Prot. Chem., 16, 1-138.

- MANNING J. M. (1970) - *Determination of D- and L-amino acid residues in peptides. Use of tritiated hydrochloric acid to correct for racemization during acid hydrolysis.* Journ. Am. Chem. Soc., 95, 7449-7454.
- MANNING J. M. & MOORE S. (1968) - *Determination of D- and L-amino acids by ion exchange chromatography as L-D and L-L dipeptides.* Journ. Biol. Chem., 243, 5591-5597.
- MINELLONO F. (1972) - *Incisioni paleolitiche su osso e calcare rinvenute a Vado all'Arancio.* Atti XIV Riun. Sc. Ist. It. Preist. Protost., 207-214, Firenze.
- MINISTERO LAVORI PUBBLICI (1966) - *Distribuzione della temperatura in Italia nel trentennio 1926-1955, Italia Centrale.* Servizio Idrografico, 21, 2^a ediz.
- OLSSON I. U. & alii (1974) - *A comparison of different methods for pretreatment of bones.* I. Geol. Foren. Stockholm Forhand., 96, 171-181.
- PALMA DI CESNOLA A. (1974) - *Su alcune recenti scoperte nei livelli gravettiani della Grotta Paglicci (Promontorio del Gargano).* Zephyrus, 25, 65-79.
- RADMILLI A. M. (1974) - *Gli scavi nella Grotta Polesini a Ponte Lucano di Tivoli e la più antica arte nel Lazio.* Origines, Sansoni Editore, Firenze, 1-131.
- RADMILLI A. M. (1977) - *Storia dell'Abruzzo dalle origini all'età del bronzo.* Giardini Editore e Stampatori, Pisa, 457 pp.
- SHACKLETON N. J. & OPDYKE N. D. (1973) - *Oxygen isotope and paleomagnetic Stratigraphy of Equatorial Pacific core 128-238: oxygen isotope temperatures and ice volumes on a 10⁵-year and 10⁶-year scale.* Quat. Res., 3, 39-53.
- TUREKIAN K. K. & BADA J. L. (1972) - *The dating of fossil bones.* In « Calibration of hominoid evolution, W. W. BISHOP, J. A. MILLER & S. COLE (eds.) Edimburgh: Scottish Academic Press, 171-185 ».