



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

U.O.I. DI SCIENZE

Dipartimento di Geoscienze

TESI DI LAUREA TRIENNALE IN GEOLOGIA

**EFFICACIA DEI NUOVI METODI DI  
PREPARAZIONE DI CAMPIONI PER  
L'ANALISI PALINOLOGICA: UNA  
VERIFICA SPERIMENTALE**

*Relatore: Dr. Luca Capraro*

*Laureando: Ivan Pablo Vergara*

ANNO ACCADEMICO 2012 / 2013

# Indice

1. Capitolo 1 – Introduzione e scopi	pag. 2
1.1    La sezione di Monte San Nicola	pag. 4
2. Capitolo 2 – Materiali e metodi	pag. 9
2.1    Procedure con acqua ossigenata	pag. 9
2.2    Procedura “tradizionale”	pag. 14
Conclusioni	pag. 17
Bibliografia	pag. 19

## *Capitolo 1 – Introduzione e scopi*

Questo lavoro di Tesi ha avuto come tematica il confronto fra due differenti metodi per l'estrazione di palinomorfi terrestri da sedimenti marini profondi di età plio-pleistocenica. I campioni utilizzati sono stati raccolti nell'area di Gela (CL), in Sicilia, e appartengono ad una potente successione sedimentaria a prevalente composizione argilloso-marnosa (Fm. Di Monte Narbone) entro cui è stato definito lo strato tipo del Piano Gelasiano (ca. 2.6 - 1.8 Ma). Ciascuno dei campioni studiati, raccolti durante una campagna nella primavera del 2012, consiste di ca. 500-600 grammi di sedimento da cui vengono prelevati frammenti per diversi tipi di analisi (micropaleontologiche, geochimiche, etc.).

Per il presente lavoro, da ogni campione di roccia è stato prelevato un frammento del peso di una decina di grammi, da preparare con opportune procedure al fine di estrarne il contenuto in pollini fossili. Per ottenere questo risultato è necessario eliminare la frazione carbonatica e ridurre drasticamente quella silicatica, senza nel contempo distruggere la componente organica.

La preparazione di campioni di sedimento marino per l'analisi palinologica è tradizionalmente basata su una serie di procedure piuttosto lunghe e potenzialmente pericolose (sia per il campione che, soprattutto, per l'operatore). In particolare, i passaggi più delicati prevedono l'uso di acido fluoridrico (HF), idrossido di potassio (KOH) e acido nitrico (HNO<sub>3</sub>), sostanze estremamente aggressive il cui uso è per legge riservato a personale specializzato entro ambienti dedicati.

Per ovviare a questo problema, nel corso degli anni si sono affinate tecniche di preparazione alternative che prevedono l'uso di sostanze meno pericolose. Fra queste spicca la procedura basata sull'utilizzo prevalente di perossido di idrogeno (Sperotto, 2011), cui si affiancano

passaggi comuni alla procedura “tradizionale”. L’aspetto più importante di questo metodo è l’eliminazione del trattamento con HF e la maggiore rapidità di preparazione.

Tuttavia, i dubbi relativi all’efficacia di questo protocollo sono ancora molti. Lo scopo di questa Tesi è verificare in modo empirico quale dei due metodi sia il migliore, ossia quali dei due permetta di preservare meglio il materiale pollinico a fronte delle diverse rapidità e semplicità delle due procedure di preparazione.

### ***1.1 - La sezione di Monte San Nicola***

L’area di Monte San Nicola si trova a circa 5 km a nord-ovest della città di Gela (CL). Questo settore della Sicilia è caratterizzato dalla presenza di ampi affioramenti di sedimenti marini riferibili al Pliocene e Pleistocene, che si rinvengono in appoggio sulla Falda di Gela (Ogniben, 1969). Quest’ultima rappresenta una unità alloctona che ha sovrascorso i depositi intensamente deformati dell’intervallo Cretaceo-Eocene (“Argille Scagliose”) e del Miocene inferiore (“Flysch numidico”). I sedimenti di età plio-pleistocenica testimoniano il riempimento finale di un bacino marino di tipo piggy-back venutosi ad impostare sulla paleocatena appennino-magrebide.

Trascurando il substrato, rappresentato come già detto da corpi alloctoni di età ad oggi non ben definita, la successione esposta nei dintorni di Gela ricorda quella esposta nel distretto di Capo Rossello (AG), pur se più incompleta. Alla base della stratigrafia affiorante si riconoscono infatti le bianche, caratteristiche alternanze marna-calcare appartenenti alla Formazione dei Trubi, che qui tuttavia raggiungono una potenza inferiore ad una quarantina di metri. Nell’area in esame la loro porzione pliocenica inferiore, che nell’area di Capo Rossello è di gran lunga

dominante in termini di spessore complessivo, è infatti obliterata per cause tettoniche; in particolare, Channell et al. (1992) hanno attribuito, in base alle associazioni a foraminiferi planctonici, la parte stratigraficamente più bassa dei Trubi allo Zancleano terminale (Zona MPL3). Al di sopra, con un contatto transizionale ben apprezzabile dalla distanza, si sviluppa la Fm. di Monte Narbone, che testimonia un graduale, importante aumento della frazione terrigena rispetto ai sottostanti Trubi. Anche la Fm. di Monte Narbone, che qui mostra uno spessore complessivo localmente superiore ai 100 m, è organizzata in coppiette, spesso ben riconoscibili da lontano, definite da uno strato più scuro (grigio, più argilloso) e uno più chiaro, di colore biancastro su superficie alterata e asciutta, in cui la frazione carbonatica è più abbondante. Alcuni degli orizzonti argillosi mostrano caratteri litologici particolari: si tratta di livelli nerastri, vistosamente bioturbati con prevalenza di *Chondrites*, o strati di colore rossastro all'alterazione, fittamente laminati e talora ricchi di grossi gusci di foraminiferi planctonici adattati ad acque iposaline, ben visibili anche a occhio nudo (*Orbulina* sp.). Nella sezione studiata, così come nelle altre sezioni di riferimento, questi orizzonti peculiari sono ben presenti nella parte più bassa e più alta della Fm. di Monte Narbone, e tipicamente assenti nella sua porzione centrale. Entrambe le facies nerastre bioturbate e rossastre laminate sono state interpretate come correlative ai Mediterranean Precession-Related Sapropel (MPRS) di Lourens et al. (1996). Questi orizzonti sapropel-equivalenti forniscono quindi un collegamento con le altre sezioni di riferimento del Mediterraneo e soprattutto, trattandosi di eventi datati su base astronomica, rappresentano vincoli cronologici di assoluta affidabilità e precisione.

Il sapropel-equivalente sommitale è così riconoscibile e tracciabile da aver meritato un nome particolare, ossia "Nicola bed". Al di sopra del Nicola bed si sviluppano circa 6 metri di marne grigie apparentemente

omogenee e monotone, che ospitano l'intervallo fra il MIS 100 e il MIS 96 (base del Gelasiano; Becker et al., 2005), a loro volta seguite da altri due livelli sapropel-equivalenti. Sopra questi ultimi si riconosce una serie di bande scure argillose che, tuttavia, sono meno chiaramente correlative ai MPRS, essendo non laminate e poco distintive rispetto alle marne a loro intercalate. Nella parte più alta della sezione, dove la frazione argillosa diventa dominante e non si distinguono più le coppie argilla/marna, si riconosce un cluster di 5 sapropel-equivalenti fittamente laminati, di cui due sono eccezionalmente spessi (oltre 1,5 m).

Simili spessori e l'aumento della frazione argillosa suggeriscono un aumento significativo dei tassi di sedimentazione media rispetto alla stratigrafia sottostante. Questi sapropel-equivalenti sommitali possono essere facilmente correlati con quelli della sezione Vrica (Calabria), in base sia al modello di distribuzione caratteristica dei MPRS che alla posizione in cui è stata riconosciuta la LO di *Gephyrocapsa oceanica* s.l., la cui comparsa nel Mediterraneo definisce la base del Calabriano (Cita et al., 2008). La parte sommitale della Fm. di Monte Narbone, sulla base della microflora a nannofossili calcarei, è riferibile alla Zona a *Helicosphaera sellii* (limite Calabriano-Santerniiano, ca. 1,6 Ma). Sopra la Fm. di Monte Narbone è presente un pacco spesso ca. 10-15 metri di arenarie marine, attribuibili alla Fm. di Agrigento, che testimoniano la regressione marina finale nell'area.

I migliori affioramenti della successione qui descritta sono concentrati lungo il versante meridionale di Monte San Nicola. Qui Spaak (1983) descrisse per la prima volta una sezione stratigrafica, seguendo il profilo che verrà poi utilizzato da Hilgen (1991) per stabilire la Pliocene Astronomical Time Scale (ATS). Il profilo, lungo circa 160 m, è stato successivamente studiato da Channell et al. (1992) per uno studio biomagnetostratigrafico integrato, che ha permesso di documentare le

buone proprietà magnetiche e il ricco contenuto micropaleontologico della successione.

Dopo la definizione del GSSP del Gelasiano (Rio et al., 1998), la sezione di Monte San Nicola è stata per anni trascurata dai grandi progetti di stratigrafia integrata. Solo nel 2005 Becker et al. hanno pubblicato uno studio ad alta risoluzione nella parte inferiore della Fm. di Monte Narbone, nell'intorno del MIS 100 (poco al di sopra della base del Gelasiano), dove si è evidenziata la presenza di variazioni climatiche ad alta frequenza (a scala sub-milankoviana) che ricordano i famosi Heinrich e Dansgaard-Oeschger Events del tardo Pleistocene.

Quindi, è evidente che la sezione di Monte San Nicola contiene tutto il Piano Gelasiano e, come tale, questo profilo è adatto a definire la “Unit Stratotype” del Gelasiano. L'interesse di questo progetto è arricchito dalla recente decisione di ridefinire il Gelasiano come Piano basale del Pleistocene, che lo ha reso suo malgrado un'unità stratigrafica di interesse culturale e scientifico molto maggiore che in precedenza. Una simile rivisitazione necessita tuttavia di un'attenta e moderna riscrittura delle informazioni relative alla sezione di riferimento. In quest'ottica si è deciso di provvedere alla ricampionatura del profilo “storico” e ad effettuare nuove analisi con una risoluzione molto superiore a quella disponibile in base alle campionature “storiche”. In Figura 1 è riportata una sintesi delle stratigrafie riconosciute lungo due diversi profili tracciati sul versante meridionale di Monte San Nicola. Anche se la distribuzione dei principali orizzonti è pressochè identica fra le due sezioni, è intuibile che sussistono differenze (talvolta significative) negli spessori fra i diversi intervalli; queste derivano sia da processi tettonici recenti che da fenomeni sinsedimentari.

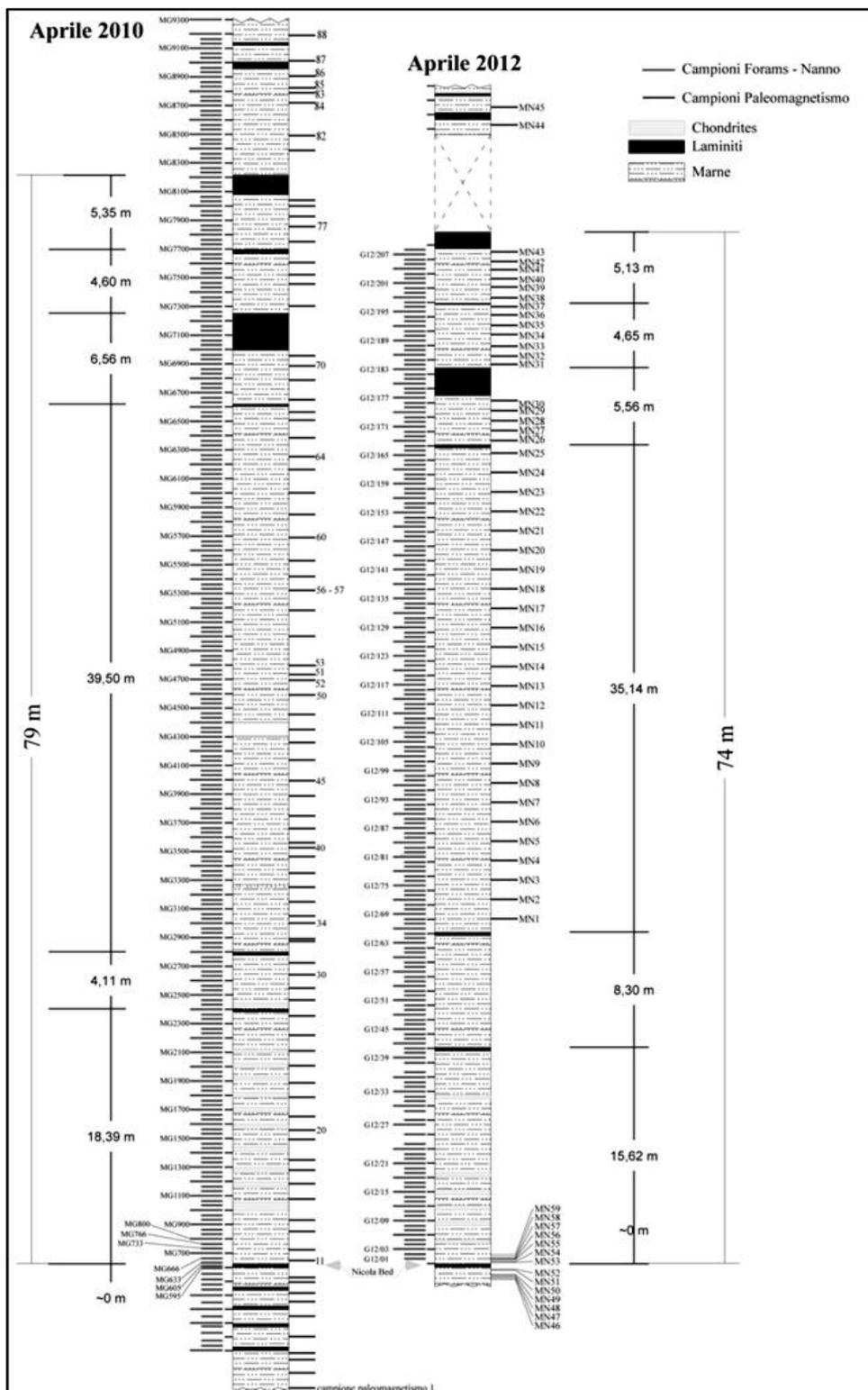


Fig. 1 – Log delle campionature effettuate lungo il versante sud di Monte San Nicola negli anni 2010 e 2012.

## ***Capitolo 2 – Materiali e metodi***

I campioni utilizzati sono stati scelti in modo casuale. Da un batch iniziale di 15 campioni, preparati utilizzando il metodo con il perossido di idrogeno, si è deciso, per motivi logistici, di ridurre a 3 soli i campioni da preparare col metodo “tradizionale”. Qui di seguito vengono illustrate in dettaglio le procedure seguite.

### ***2.1 – Procedura con acqua ossigenata***

Per prima cosa sono stati prelevati i campioni con mazzuolo e scalpello, poi con un cutter si è asportata la parte più esterna e potenzialmente contaminata e/o alterata fino a portarli a un peso di approssimativamente 10 grammi.

I campioni sono stati essiccati per 24 ore nel forno del laboratorio a una temperatura di 50°C; poi sono stati macinati attraverso l'uso di mortaio e pestello di ceramica.

#### ***Trattamento con acido cloridrico***

Dopo aver versato la polvere in beaker di vetro di 500 ml, il passaggio successivo è stato quello di aggiungere un quantitativo di acido cloridrico in soluzione acquosa al 15% tale da ricoprire completamente il prodotto della macinazione. Per favorire una completa aggressione chimica, ogni campione è stato mescolato manualmente per la durata della reazione.

Il processo chimico che coinvolge l'acido cloridrico è caratterizzato dallo sviluppo di una limitata effervescenza, richiede pochi minuti per esser

portato a compimento e determina la dissoluzione all'interno del sedimento della frazione carbonatica.

La formula sotto indicata illustra, nello specifico, i reagenti coinvolti e i relativi prodotti:



Esaurita la reazione è stato diluito con acqua deionizzata fino a portare a volume. I campioni sono stati lavati e setacciati con una maglia di 10 µm, andando a conservare la frazione superiore a tali dimensioni. Essendo importante evitare contaminazioni, al termine di ciascun filtraggio, il setaccio è stato smontato e lavato accuratamente con acqua e sapone ma è stato anche immerso nella lavatrice ad ultrasuoni per cinque minuti e in fine è stato anche immerso in una soluzione di blu di metilene. In seguito il materiale trattenuto è stato versato in una ciotola di ceramica ed è stato essiccato in forno per altre 24 ore.

### ***Trattamento col perossido di idrogeno***

L'acqua ossigenata è una sostanza di colore blu pallido, se pura, che passa ad incolore una volta diluita. Essa risulta essere un forte agente ossidante, con deboli proprietà acide ed è stata impiegata in questo contesto per effettuare la disgregazione fisico-chimica della frazione minerale e della sostanza organica amorfa. L'obiettivo di tale trattamento è duplice: frammentare gli aggregati mineralici o organici che possono inglobare i granuli pollinici per favorirne l'isolamento e l'individualizzazione, e ridurre le dimensioni degli stessi agglomerati in modo da consentire l'eliminazione successiva tramite setaccio.

Inizialmente il procedimento prevede di versare il materiale essiccato in una ciotola preriscaldata a 70°C sulla piastra. Viene poi aggiunta una soluzione acquosa di perossido di idrogeno al 15%, in quantità sufficiente da ricoprire interamente la polvere anidra. Si può osservare come il perossido d'idrogeno si dissocia spontaneamente in acqua e ossigeno, processo che determina la formazione all'interno del sedimento di bolle di gas, le quali, espandendosi, esercitano una pressione di carattere estensionale, responsabile della disintegrazione fisica delle particelle detritiche. La reazione passa da una fase iniziale fortemente esotermica ed esplosiva, ad una caratterizzata da effervescenza media o ridotta ma prolungata nel tempo. Dopo 10 minuti dall'inizio della reazione sono stati aggiunti nella ciotola 250 ml di acqua deionizzata, allo scopo di interrompere il processo chimico e diluire il reagente. Il tutto è stato riversato in grandi beaker da 2 litri aggiungendo ulteriore acqua deionizzata. Dopo aver aspettato 30 minuti affinché i sedimenti si depositassero, il contenuto del beaker è stato filtrato con un setaccio da 10 micron, conservando la frazione trattenuta. Quest'ultimo lavoro si è ripetuto due volte per assicurarci di evitare danni da ossidazione. In fine la frazione trattenuta è stata travasata in una ciotola e si è lasciata ad asciugare in forno.

### ***Trattamento col cloruro di zinco***

Il sale di cloruro di zinco in soluzione è un liquido pesante utilizzato in questo lavoro per separare la frazione minerale da quella pollinica. La polvere seccata è stata trasferita con l'ausilio di un cutter (dato che la polvere si appiccica alla ciotola) all'interno di provette falcon a fondo conico della capacità di 50 ml. Dopo avervi aggiunto una quantità di cloruro di zinco in proporzione pari a 1,5, il campione residuo è stato omogeneizzato con un agitatore vibromeccanico o vortex per pochi

minuti, tempo sufficiente per distribuire uniformemente il liquido pesante. A questo punto le provette falcon sono state portate a 3000 giri per 5 minuti in centrifuga; quest'ultima consente di accelerare la sedimentazione delle particelle favorendo la separazione di fase liquido-solido.

Una volta estratto, il campione dovrebbe risultare separato in tre fasi in base alla densità. Il cloruro di zinco è stato infatti preparato per avere una densità relativa pari circa a 2; quindi la frazione minerale più pesante con densità relativa superiore a 2 tende ad affondare mentre, la soluzione di cloruro di zinco rimane nella fase intermedia e su di essa galleggia la frazione pollinica che ha una densità di circa 1,5. In un'altra falcon è stata successivamente versata la porzione soprastante cioè quella composta dal liquido pesante e dai pollini, facendo attenzione a non mobilitare il detrito e, ad essa sono stati aggiunti 20 ml di acido cloridrico in modo tale da abbassare la densità del liquido ad un valore inferiore rispetto a quella del polline. La nuova provetta contenente i pollini ha subito quindi un nuovo passaggio in centrifuga a 3700 giri per 10 minuti. Il liquido soprastante se limpido è stato poi eliminato, mentre che il sedimento che è rimasto sotto, è stato lavato con l'acqua deionizzata (si aggiunge acqua fino a portare a volume, si centrifuga e una volta decantato si toglie il liquido tenendo molta cura di non togliere anche il sedimento). Questa procedura è stata ripetuta fino che il materiale non avesse più odore ad acido e/o un colore giallognolo. Dopo di che, il materiale è stato messo in un eppendorf, al quale si è aggiunto 2 gocce di glicerina. Per ultimo si è fatto il vetrino: con un contagocce si è mischiato la glicerina e i pollini fino a quando il liquido non fosse omogeneo, a questo punto con il contagocce si è versata una piccola goccia sul vetrino.

<b>Numero campione</b>	<b>Campione iniziale</b>	<b>Campione secco</b>	<b>HCl</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>
G 71	11,5 g	10,2 g	3,46 g	2,5 g
G 146	10,5 g	9,4 g	4,83 g	3 g
G 206	12,5 g	11,3 g	2,35 g	1,5 g

Tabella dei pesi per la procedura con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## ***2.2 – Procedura “tradizionale”***

In questa procedura, anziché  $H_2O_2$  si utilizzano acido fluoridrico, esametafosfato di sodio  $(NaPO_3)_6$  e idrossido di potassio (KOH); il campione viene anche fatto reagire con acido cloridrico e separato gravitativamente con cloruro di zinco. E' importante sottolineare che si tratta di un protocollo molto più lungo e, soprattutto, più pericoloso principalmente a causa dell'elevata tossicità dell'HF.

### ***Trattamento con acido cloridrico***

Dopo aver prelevato il campione, abbiamo tolto con un cutter la parte alterata ma questa volta portando il campione a 15 grammi invece che a dieci.

Dopo essere stati essiccati e macinati, sono stati messi in una ciotola, dove si è aggiunto HCl freddo al 20 %. Dopo approssimativamente un'ora, quando la reazione aveva finito, si è aggiunto acqua distillata fino a portare a volume il beacker di 500 ml. Successivamente si è inserito il beacker in centrifuga ed è stato portato a 2500 giri per 10 minuti, una volta decantato è stato eliminato il liquido soprastante.

### ***Trattamento con acido fluoridrico***

Si è aggiunto acido fluoridrico freddo al 40%, dopo aver aspettato 24 ore è stato lavato prima con l'acqua deionizzata e poi con l'acido cloridrico. A continuazione è stato aggiunto nuovamente HCl ma questa volta si è lasciata riscaldare la soluzione per 4 ore a bagnomaria, per dopo

centrifugarla e buttare il liquido. Per ultimo è stato lavato con acqua deionizzata per assicurarsi di togliere tutto l'HCl possibile.

### ***Trattamento con esametafosfato di sodio***

L'esametafosfato di sodio è un sale organico di colore bianco, estremamente solubile in acqua ed è stato sfruttato in quest'ambito per le sue proprietà deflocculanti. Gli ioni fosfato, infatti, vengono fortemente adsorbiti dalle particelle di argilla e questo processo porta alla presenza di alte cariche positive sulla superficie dei pacchetti costituenti la struttura dei minerali argillosi. Per l'alta repulsione delle cariche, tali pacchetti sono portati ad allontanarsi portando alla disintegrazione delle lamine fillosilicatiche e impedendo una eventuale riagggregazione delle stesse. In questo lavoro per prima cosa, è stata preparata una soluzione, sciogliendo, all'interno di un beaker, 12,2 grammi del sale in 100 ml di acqua deionizzata. Tale soluzione è stata aggiunta in quantità sufficiente da ricoprire il campione travasato in un beaker di 500 ml, in seguito è stata addizionata acqua deionizzata fino a portare a volume, si è fatto centrifugare e si è eliminato il liquido soprastante nel caso fosse trasparente (nel caso contrario è stata utilizzata la centrifuga di nuovo).

### ***Trattamento con idrossido di potassio***

Questo prodotto chimico è stato utilizzato per eliminare gli acidi umici e per rigonfiare i pollini dei quali è rimasta solo la parte esterna.

L'idrossido di potassio in soluzione acquosa al 10% (100 grammi per litro) è stato travasato in dei beacker di 250 ml insieme ai campioni e si è fatto bollire per qualche minuto, dipendendo dalle sostanze umiche.

Dopo essere stato setacciato a 180 micron, il sedimento trattenuto è stato travasato a una falcon ed è stato lavato.

### *Trattamento con cloruro di zinco e ultrasuoni*

Anche in questa procedura è stato utilizzato il ZnCl con gli stessi passi, ma con l'unica differenza che questa volta la proporzione era di 1:1 col residuo.

Per ultimo sono stati utilizzati gli ultrasuoni. Si tratta di uno strumento che sfrutta l'energia meccanica prodotta da onde sonore ad alta frequenza. Le vibrazioni si propagano uniformemente attraverso l'acqua che riempie la vasca della lavatrice, mettendo in agitazione le particelle di matrice che inglobano i granuli pollinici, ne aumentano l'energia cinetica e favoriscono la loro disgregazione.

Tale metodo deve essere eseguito con una certa cautela poiché sia l'uso di ultrasuoni ad un'errata frequenza d'onda, che l'azione troppo prolungata possono portare al danneggiamento e alla distruzione di alcuni granuli.

Il contenuto della provetta è stato filtrato con setacci da 10  $\mu\text{m}$ , è stato lavato con acqua distillata e lasciato asciugare. Per ultimo è stato raccolto il residuo con un contagocce ed è stato inserito in un'eppendorf insieme a una o due gocce di glicerina.

## CONCLUSIONI

Concluse le preparazioni, l'efficacia delle due diverse procedure è stata testata confrontando i vetrini relativi agli stessi campioni. A questo scopo si è deciso di preparare alcuni vetrini per l'osservazione microscopica, entro i quali sono stati contati i granuli pollinici bisaccati presenti (Fig. 2). Questi sono pollini riferibili a pinacee (soprattutto *Pinus*), e si rivelano fra i granuli più comuni, resistenti e di facile riconoscimento.

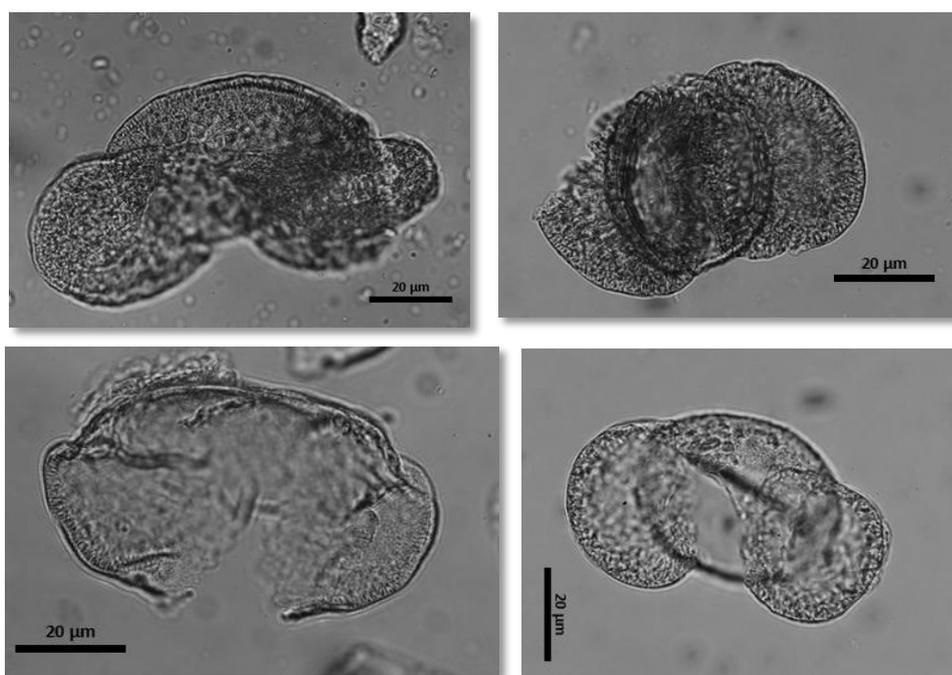


Figura 2 – Granuli pollinici bisaccati appartenenti a diversi generi.  
Dall'alto a sinistra, in senso orario: *Abies*, *Cedrus*. *Pinus* tipo *diploxylon*,  
*Picea*.

E' ragionevole pensare che, avendo l'accortezza di realizzare vetrini con la stessa quantità di sospensione, la differenza nel numero di granuli fra campioni preparati con metodi diversi sia un buon indicatore del grado di

efficacia del metodo. In base ai dati raccolti, è verosimile che il metodo con acqua ossigenata - pur essendo più veloce e pratico - danneggi e addirittura distrugga il contenuto pollinico dei campioni. Infatti, la tabella seguente evidenzia che i vetrini dei campioni preparati con la procedura “tradizionale” sono, nel complesso, molto più ricchi in granuli pollinici:

CAMPIONE	VETRINO n. 1	VETRINO n. 2	TOTALE POLLINI
71 CON H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	18	36	54
71 CON HF	59	230	289
146 CON H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7	10	17
146 CON HF	29	78	107
206 CON H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3	4	7
206 CON HF	7	14	21

Quindi, malgrado le cautele usate (es. lasciar reagire il campione soltanto 10 minuti e diluire il perossido di ossigeno in beaker di 2 litri allo scopo di limitare l’ossidazione), il protocollo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è da considerare non efficace, poiché in pochi minuti ha dissolto le pareti degli palinomorfi. Si raccomanda quindi di non utilizzare questa procedura se non in casi eccezionali, preferendo piuttosto il metodo “tradizionale”.

## BIBLIOGRAFIA

- Becker J., Lourens L.J., Hilgen F.J., van der Laan E., Kouwenhoven T.J., Reichart G.-J. (2005) - Late Pliocene climate variability on Milankovitch to millennial time scales: a high-resolution study of MIS100 from the Mediterranean. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 228, pp. 338-360.
- Berggren W.A., Kent D.V., Van Couvering, J.A. (1985) - Neogene geochronology and chronostratigraphy, in Snelling, N.J. (ed.), *Geochronology and the Geologic Record: Geol. Soc. (London) Special Paper*, pp. 211–260.
- Channell J., Di Stefano E., Sprovieri R. (1992) - Calcareous Plankton Biostratigraphy, Magnetostratigraphy and Paleoclimatic History of the Plio-Pleistocene Monte San Nicola Section (Southern Sicily), *Boll. Soc. Paleont. It.*, v. 31, pp. 351–382.
- Cita M.B. (1973) - Planktonic foraminiferal biozonation of the Mediterranean Pliocene deep sea record. A revision: *Rivista Italiana di Paleontologia e Stratigrafia*, v. 81. pp. 527-544.
- Cita M.B., Capraro L., Ciaranfi N., Di Stefano E., Lirer F., Maiorano P., Marino M., Raffi I., Rio D., Sprovieri R., Stefanelli S., Vai G.B. (2008) - The Calabrian Stage redefined. *Episodes*, 31, pp. 418-429.
- Hilgen F.J. (1991) - Extension of the astronomically calibrated (polarity) time scale to the Miocene/Pliocene boundary. *Earth Planetary Science Letters* 107, 349-368.

- Lourens L. J., Antonarakou A., Hilgen, F. J., Van Hoof A. A. M., Vergnaud-Grazzini C., Zachariasse W. (1996) - Evaluation of the Plio-Pleistocene astronomical timescale. *Paleoceanography*, 11, 391-413.
- Lyell, C. (1833) - *Principles of Geology*. John Murray Ed., London. Vol. 1, 511 pp.; Vol. 2, 330 pp.; Vol. 3, 398 pp.
- Ogniben L. (1969) – Schema introduttivo alla geologia del confine calabro-lucano. *Mem. Soc. Geol. It.*, 8, pp. 453-763.
- Rio D., Raffi I., Villa G. (1990) - Pliocene-Pleistocene calcareous nannofossils distribution patterns in the Western Mediterranean, in Kastens, K A, Mascle, J, et al., *Proc. ODP, Sci. Results*, v. 107, pp. 513–533.
- Rio D., Sprovieri R., Castradori D., Di Stefano E. (1998) - The Gelasian Stage (Upper Pliocene): A new unit of the global standard chronostratigraphic scale. *Episodes*, 21, 2, 82-87.
- Rio D., Sprovieri R., Di Stefano E. (1994) - The Gelasian Stage: a proposal of a new chronostratigraphic unit of the Pliocene Series: *Riv. It. Paleont. Strat.*, 100, 103–124.
- Rio D., Sprovieri R., Raffi I., Valleri G. (1988) - Biostratigrafia e paleoecologia della sezione stratotipica del Piacenziano. *Boll. Soc. Paleont. It.*, v. 27, pp. 213–238.

Rio D., Sprovieri R., Thunell R. (1991) - Pliocene-lower Pleistocene chronostratigraphy: A re-evaluation of Mediterranean type sections: Geol. Soc. Am. Bull., v. 103, pp. 1049–1058.

Spaak P. (1983) - Accuracy in correlation and ecological aspects of the planktonic foraminiferal zonation of the Mediterranean Pliocene: Utrecht Micropaleontology Bulletin, v. 28. pp. 1-159.

Sperotto W. (2011) - Sviluppo e confronto di metodologie per l'estrazione di sporomorfi da sedimenti marini di età pleistocenica. Tesi di Laurea Magistrale in Scienze della Natura, Università degli Studi di Padova.