

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO OXIDATIVO DE LA MATERIA ORGÁNICA
TERMALMENTE ALTERADA DE LOS PALINOMORFOS**

ALBA LUZ ARCINIEGAS MEJÍA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO OXIDATIVO DE LA MATERIA ORGÁNICA
TERMALMENTE ALTERADA DE LOS PALINOMORFOS**

ALBA LUZ ARCINIEGAS MEJÍA

**TRABAJO DE GRADO REALIZADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICA**

Directores

**Martha Cecilia Daza Espinosa
Universidad Industrial de Santander**

**Carlos Alberto Jaramillo Muñoz
Ecopetrol-Instituto Colombiano del Petróleo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

DEDICATORIA

*A Dios por guiarme cada día para conocer el verdadero sentido de la vida.
A mi madre y a la memoria de mi padre, por su ejemplo de entrega y amor,
por apoyarme en este sueño y quienes iluminaron mi vida.
A mis familiares y amigos por su apoyo y colaboración en los momentos más difíciles.*

AGRADECIMIENTOS

A quienes con sus enseñanzas hicieron de mi una profesional integral:

- ❖ A la profesora Martha por su paciencia, su esfuerzo invaluable para transmitir conocimiento y su estímulo constante para que creciera como persona y como profesional y al Dr. Carlos Alberto por su colaboración en la realización de mi trabajo.
- ❖ A Luis Fernando Peña, director del laboratorio de Procesamiento de muestras geológicas por su atención y ayuda oportuna.
- ❖ A mis profesores, por enseñarme a querer la ciencia y por demostrarme lo mucho que queda por aprender.
- ❖ A la UIS por ser Alma Mater que me abrió sus puertas para que pudiese entrar al maravilloso mucho del conocimiento.

A quienes han contribuido en la culminación de esta etapa de mi vida:

- ❖ A mis padres Alvaro y Luz Marina, por su incalculable e invaluable apoyo que obtuve de ellos para que realizara mi sueño.
- ❖ A mis compañeros y amigos a lo largo de esta carrera, en especial a Angela, Ronald y Yeffer.
- ❖ A todas las personas que de una u otra forma me apoyaron durante el transcurso de esta investigación.

RESUMEN

TÍTULO: IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO OXIDATIVO DE LA MATERIA ORGÁNICA TERMALMENTE ALTERADA DE LOS PALINOMORFOS *

AUTOR: ARCINIEGAS MEJIA, Alba Luz **

PALABRAS CLAVES: Palinomorfos, esporopolenina, maduración termal, oxidación, fósil, palinología.

DESCRIPCIÓN:

Los palinomorfos son fósiles de granos de polen y esporas que contienen en su cubierta externa una macromolécula altamente resistente a la degradación, la esporopolenina. Estos microfósiles son utilizados como indicadores de presencia de petróleo y para su clasificación taxonómica se tiene en cuenta las ornamentaciones presentes en su cubierta externa, denominada exina. Sin embargo con frecuencia presentan un color oscuro debido a la maduración termal ocurrida en los procesos geoquímicos que dificulta su clasificación.

Por tal razón, en esta tesis implementamos un método oxidativo para aclarar su coloración y facilitar su identificación taxonómica para estudios de datación de pozos petroleros. Utilizamos palinomorfos extraídos de la formación Rosa Blanca del municipio de Zapotoca a los que tratamos con diferentes oxidantes, tales como las soluciones de Schulze y HNO_3 al 65%, de Ramsay, de NaClO_3 0,56 M y HNO_3 0,82 M, de KOH al 10%, HNO_3 fumante, de NaOCl al 7%, de H_2O_2 al 10% y de KMnO_4 al 10% y el método de acetólisis. El estado de maduración termal y el efecto de distintos oxidantes y del tiempo de tratamiento sobre la coloración de los palinomorfos extraídos lo evaluamos cuantitativamente utilizando el Software Adobe Photoshop 7.0 y un análisis estadístico de varianza.

La intensidad en la coloración del amarillo de estos palinomorfos fue del 59% y después del tratamiento con la solución de NaClO_3 0,56 M y HNO_3 0,82 M aumentó al 69%. Los demás oxidantes utilizados no produjeron aclaraciones del color estadísticamente significativas. La decoloración obtenida con esta solución permite observar las ornamentaciones de la capa externa de estos palinomorfos para su identificación taxonómica.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Martha Cecilia Daza Espinosa

ABSTRACT

TITLE: IMPLEMENTATION OF A OXIDATIVE METHOD OF THE ORGANIC MATTER THERMALLY ALTERED OF THE PALYNOMORPHS *

AUTHOR: ARCINIEGAS MEJÍA, Alba Luz **

KEY WORDS: Palynomorphs, esporopolenine, thermal maturation, oxidation, fossil, palinology.

DESCRIPTION:

The palynomorphs are fossils of grains of pollen and spores that contain in their external cover a macromolecule highly resistant to the degradation, the esporopolenine. These microfossils are used as indicators of presence of petroleum and for their taxonomic classification keeps in mind the present ornamentations in their cover external, denominated exine. However frequently they present a dark color due to the thermal maturation happened in the geochemical processes that it hinders their classification.

For such a reason, in this thesis we implement a oxidative method to clarify their coloration and to facilitate their taxonomic identification for studies of datation of oil wells. We use palynomorphs extracted of the formation Rosa Blanca of the municipality from Zapatoca to those that try with different oxidizers, such as the solutions of Schulze and HNO₃ to 65%, of Ramsay, of NaClO₃ 0,56 M and HNO₃ 0,82 M, of KOH to 10%, HNO₃ fumant, of NaOCl to 7%, of H₂O₂ to 10% and of KMnO₄ to 10% and the acetolysis method. The state of thermal maturation and the effect of different oxidizers and of the time of treatment on the coloration of the palynomorphs extracted we evaluate quantitatively using the Software Adobe Photoshop 7.0 and a statistical analysis of variance.

The intensity in the coloration of the yellow of these palynomorphs was of 59% and after the treatment with the solution of NaClO₃ 0,56 M and HNO₃ 0,82 M increased to 69%. The other used oxidizers didn't produce explanations of the color statistically significant. The fading obtained with this solution allows observing the ornamentations of the external layer of these palynomorphs for its taxonomic identification.

* Grade Project

** Faculty of Sciences. School of Chemical. Martha Cecilia Daza Espinosa

TABLA DE CONTENIDO

	ÍNDICE
LISTA DE ACRÓNIMOS	11
LISTA DE TABLAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
INTRODUCCIÓN	14
I. MARCO TEÓRICO	16
1. PALINOMORFOS	16
1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA	16
1.1.1. Quitina	16
1.1.2. Esporopolenina	17
2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA ESPOROPOLENINA	20
2.1. EVIDENCIA QUÍMICA	21
2.2. EVIDENCIA CITOQUÍMICA	21
2.3. ESTUDIOS GEOQUÍMICOS DE LA ESPOROPOLENINA	21
2.4. CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA ESPOROPOLENINA	22
3. MADURACIÓN TERMAL DE LA ESPOROPOLENINA	23
4. PROCESAMIENTO PALINOLÓGICO	24
4.1. LA OXIDACIÓN EN PROCESOS PALINOLÓGICOS.	25
4.1.1. Técnica con hidróxido de potasio	26
4.1.2. Técnica de acetólisis	26
4.1.3. Técnica con peróxido de hidrógeno	26
4.1.4. Combinaciones con ácido nítrico	27
4.1.5. Otras técnicas de oxidación	27
5. APLICACIONES DE LA PALINOLOGÍA	28

6.	ADOBE PHOTOSHOP 7.0	29
6.1.	EL MODELO DE COLOR RGB	29
6.2.	EL MODELO DE COLOR CMYK	30
7.	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)	31
7.1.	VARIACIÓN TOTAL	31
7.1.1.	Variación dentro de tratamientos	31
7.1.2.	Variación entre los tratamientos	32
7.2.	MODELO DE DOS FACTORES	34
7.3.	USO DE LA COMPUTADORA PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO	35
7.3.1.	Paquete estadístico STATGRAPHICS	35
II.	PARTE EXPERIMENTAL	36
1.	EXTRACCIÓN DE PALINOMORFOS	36
2.	PREPARACIÓN DE LOS PALINOMORFOS PARA LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	37
3.	OXIDACIÓN DE LOS PALINOMORFOS	37
3.1.	Solución de Schulze [8].	38
3.2.	Ácido nítrico al 65.	38
3.3.	OTROS OXIDANTES	38
3.3.1.	Solución de Clorato de sodio 0,56 M y ácido nítrico 0,82 M.	39
3.3.2.	Solución Ramsay [20].	39
3.3.3.	Acetólisis [8].	39
3.3.4.	Hidróxido de potasio al 10% [8].	40
3.3.5.	Acido nítrico fumante.	40
3.3.6.	Hipoclorito de sodio al 7% [11].	40
3.3.7.	Peróxido de hidrógeno al 10% [8].	41
3.3.8.	Permanganato de potasio al 10% [,].	41
4.	ANÁLISIS PALINOLÓGICO	41
5.	DETERMINACIÓN DE LA COLORACIÓN DE LOS PALINOMORFOS	42

III. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	43
1. DESCRIPCIÓN DE LOS PALINOMORFOS DE LA FORMACIÓN ROSA BLANCA DEL MUNICIPIO DE ZAPATOCA, SANTANDER.	43
2. EFECTO DEL TRATAMIENTO OXIDATIVO SOBRE LOS PALINOMORFOS	43
3. EFECTO DE OTROS OXIDANTES	44
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
4.1. TRATAMIENTOS CON TIEMPOS DE REACCIÓN ENTRE 10 Y 40 MINUTOS.	46
4.2. TRATAMIENTOS CON TIEMPOS DE REACCIÓN ENTRE 4 Y 21 HORAS.	49
IV. CONCLUSIONES	53
V. RECOMENDACIONES	53
ANEXO 1. LISTA DE PLANCHAS CORRESPONDIENTES A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS OXIDATIVOS	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE ACRÓNIMOS

LM	Microscopía de luz
SAM	Microscopía acústica de barrido
LSD	Microscopía de barrido con láser
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
FT-IR	Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier
ICP	Instituto Colombiano del Petróleo
e.g.	Por ejemplo
rpm	Revoluciones por minuto
ppm	Partes por millón
M	Molaridad (unidad de concentración)
min	Minutos
T.A.I.	Índice de alteración termal
ANOVA	Análisis de varianza
SCI	Índice de coloración de esporas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ZnCl₂	Cloruro de zinc
CO₂	Dióxido de carbono
CH₃COOH	Ácido acético
HF	Ácido fluorhídrico
HCl	Ácido clorhídrico
HNO₃	Ácido nítrico
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
NaClO₃	Clorato de sodio
KClO₃	Clorato de potasio
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
KMnO₄	Permanganato de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
NaOCl	Hipoclorito de sodio
Na₄P₂O₇	Pirofosfato tetrasódico
Fe(SO₄).7H₂O	Sulfato ferroso heptahidratado

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Escala de color para palinomorfos	18
Tabla 2. Coloración de la exina de esporas y polen con maduración geotermal	19
Tabla 3. Efecto de la solución de Schulze y de HNO ₃ al 65% sobre la intensidad en la coloración amarilla de los palinomorfos extraídos de la formación Rosa Blanca del municipio de Zapatoca.	37
Tabla 4. Efecto de las soluciones de NaClO ₃ 0,56 M y HNO ₃ 0,82 M, Ramsay, KOH al 10%, el método de acetólisis y el ácido nítrico fumante sobre la intensidad en la coloración amarilla de los palinomorfos extraídos de la formación Rosa Blanca del municipio de Zapatoca.	38
Tabla 5. Efecto del NaOCl al 7%, el H ₂ O ₂ al 10% y el KMnO ₄ al 10% sobre la intensidad en la coloración amarilla de los palinomorfos extraídos de la formación Rosa Blanca del municipio de Zapatoca.	39
Tabla 6. Identificación de los tratamientos oxidativos para el análisis estadístico	40
Tabla 7. Efecto del tiempo y del tipo de tratamiento sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos	40
Tabla 8. Efecto del tiempo de tratamiento sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos	41
Tabla 9. Media de los cuadrados con un intervalo de confianza del 95%	42
Tabla 10. Efecto del tiempo y del tipo de tratamiento sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos	43
Tabla 11. Efecto del tiempo de tratamiento sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos	44
Tabla 12. Media de los cuadrados con un intervalo de confianza del 95%	44

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fórmula estructural de la quitina	11
Figura 2. Fórmula estructural del ácido glucurónico	12
Figura 3. Fórmula estructural sugerida para la esporopolenina	12
Figura 4. Fórmula estructural del caucho	13
Figura 5. Fórmula estructural del β -Caroteno	15
Figura 6. Modelo de color RGB	23
Figura 7. Modelo de color CMYK	24
Figura 8. Taxa seleccionados: polen a) classopolis, b) Callialasporites y espora c) Trilete de la formación Rosa Blanca del Municipio de Zapatoca	35
Figura 9. Palinomorfos termalmente alterados	36
Figura 10. Palinomorfos oxidados con la solución de NaClO_3 0,56 M y HNO_3 2,82 M. a) Classopolis, b) Callialasporites y c) Trilete	37
Figura 11. Efecto del tiempo de reacción sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos	41
Figura 12. Efecto del método de oxidación sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos	42
Figura 13. Efecto del tiempo de reacción sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos	45
Figura 14. Efecto del método de oxidación sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos	45

INTRODUCCIÓN

Los palinomorfos (granos de polen y esporas fósiles) son utilizados en datación estratigráfica en exploraciones petroleras como indicadores de la presencia de petróleo.

Estos palinomorfos tienen en su cubierta externa una macromolécula altamente resistente a la degradación, la esporopolenina. Sin embargo, la temperatura y la presión causan modificaciones químicas y estructurales que producen un cambio de color de amarillo claro a negro, conocido como maduración termal, el cual está correlacionado con la profundidad del enterramiento de los sedimentos [¡Error! Marcador no definido.].

La identificación taxonómica de los palinomorfos madurados térmicamente es muy difícil, ya que su color negro dificulta la observación al microscopio de las ornamentaciones de su capa externa llamada exina empleadas en la identificación de la especie.

Los palinomorfos con coloraciones oscuras se denominan palinomorfos sobremaduros y son difíciles de aclarar con las técnicas de oxidación existentes, como el método de Schulze y ácido nítrico al 65% [¡Error! Marcador no definido.].

Por tal razón en el presente proyecto de tesis para optar al título de Química, implementamos un método oxidativo para tratar los palinomorfos madurados térmicamente para aclarar su coloración, facilitar su identificación taxonómica para estudios de datación y contribuir a disminuir la incertidumbre geológica durante la perforación de un pozo petrolero.

La muestra seleccionada para este trabajo proviene de la formación Rosa Blanca del municipio de Zapotoca y fue escogida porque se encuentra muy alterada termalmente y por lo tanto es altamente resistente a los métodos de oxidación convencionales.

Inicialmente se realizó la extracción de los palinomorfos que consistió en la disgregación de la roca, luego en la eliminación de los carbonatos, de los silicatos y en la separación por diferencia de densidades de la materia orgánica del resto de la muestra. Con la materia orgánica separada se procedió a valorar su estado de maduración termal analizando cuantitativamente el color con el software Adobe Photoshop 7.0 y estadísticamente con el análisis de varianza (ANOVA) con la ayuda del paquete estadístico *statgraphics*. Esta materia orgánica presentó una intensidad del color amarillo del 59%.

Después de valorar el estado de maduración termal de los palinomorfos se sometieron a la acción de diferentes oxidantes con el fin de aclarar su coloración. Se utilizaron, inicialmente la solución de Schulze y HNO₃ al 65%, oxidantes empleados en el ICP. Puesto que el cambio de coloración obtenido con estos oxidantes no fue aceptable, se utilizaron los siguientes oxidantes: solución de NaClO₃ 0,56 M y HNO₃ 0,82 M, solución Ramsay, acetólisis, KOH al 10%, HNO₃ fumante, NaOCl al 7%, H₂O₂ al 10% y KMnO₄ al 10%. El efecto oxidativo se evaluó de igual manera que el estado de maduración termal de la materia orgánica.

El método de oxidación con la solución de NaClO₃ 0,56 M y HNO₃ 0,82 M fue el mejor con respecto a los otros métodos utilizados. El porcentaje de intensidad del amarillo para los palinomorfos tratados con este método es del 69%. Con los demás oxidantes se observaron valores para la coloración de los palinomorfos similares, entre un 59 y un 64%.

Además, el análisis estadístico de la coloración de los palinomorfos obtenida con los diferentes tratamientos indica que la decoloración es independiente del tiempo de permanencia en contacto con las soluciones oxidantes y dependiente del oxidante utilizado. Aunque la diferencia en la coloración entre los palinomorfos termalmente alterados y los oxidados con la solución de NaClO₃ 0,56 M y HNO₃ 0,82 M es del 10%, el efecto visual es aceptable, para poder distinguir sus ornamentaciones y para realizar su clasificación.

Esta investigación fue financiada por el Instituto Colombiano del Petróleo. La parte experimental de este trabajo, es decir el procesamiento de la muestra, los procedimientos químicos y la preparación de las placas con los palinomorfos se llevó a cabo en el Laboratorio de Procesamiento de Muestras Geológicas y el análisis palinológico en el Laboratorio de Micropaleontología del Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) "**Juan José Turbay**".

I. MARCO TEÓRICO

1. PALINOMORFOS

Los palinomorfos son microfósiles de granos de polen y esporas que sobreviven a procedimientos extractivos aplicados a rocas y otros sedimentos y que están compuestos de moléculas orgánicas muy resistentes.

Los palinomorfos difieren de los nanofósiles y de las diatomeas. Los nanofósiles son más pequeños y están compuestos de carbonato de calcio y las diatomeas están compuestas de sílice. Tanto el carbonato de calcio como el sílice se destruyen con el procesamiento palinológico [1].

Las esporas y los granos de polen son de tamaño similar al de los palinomorfos, frecuentemente miden 20-40 μm , y están rodeados por paredes resistentes, las cuales son frecuentemente esculpidas en direcciones distintas. Aerodinámicamente, el polen y las esporas transportados por aire se conducen en direcciones similares y sus similitudes los han llevado a ser juntamente considerados en la disciplina de la palinología.

La palinología es la ciencia que estudia los palinomorfos, las esporas y los granos de polen desde el punto de vista estructural, su dispersión y el efecto de las condiciones ambientales sobre su preservación [¡Error! Marcador no definido.].

1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los palinomorfos se derivan de cuatro de los cinco reinos de organismos reconocidos: Protista, Vegetal, Hongos y Animal. El reino Mónera no produce palinomorfos [¡Error! Marcador no definido.].

La pared de los palinomorfos consta de dos compuestos o dos familias de compuestos: quitina y esporopolenina.

1.1.1. Quitina

Se encuentra en esporas, órganos de ciertos hongos, escolocodontes, órganos de artrópodos y en algunos foraminíferos.

La quitina es un homopolisacárido lineal compuesto de residuos de N-acetilglucosamina ligados por enlaces glucosídicos beta 1,4. La única diferencia con la celulosa es el reemplazo del grupo hidroxilo del carbono 2 por un grupo aminoacetilado, figura 1. La quitina forma fibras lineales semejantes a la celulosa y tampoco es digerible por vertebrados [2].

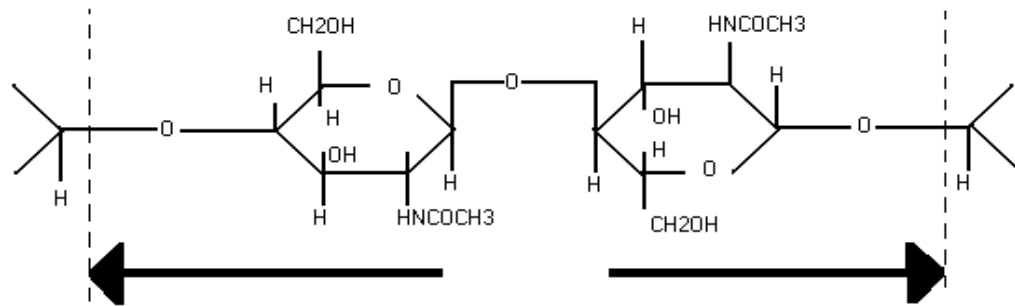


Figura 1. Fórmula estructural de la quitina

La quitina y la esporopolenina se comportan similarmente en sedimentos y en procedimientos de laboratorio. En sedimentos no consolidados la esporopolenina es de color amarillo pálido, mientras que la quitina puede ser casi clara, pero frecuentemente es oscura, marrón o naranja-marrón a marrón grisáceo. Otra propiedad similar a la esporopolenina, es la tendencia de algunos palinomorfos quitinosos a ser un poco más resistentes tanto al ataque químico como al biológico y cambiar de color por la carbonización (llamada también maduración termal o coalificación).

1.1.2. Esporopolenina

La esporopolenina forma la estructura básica de la pared resistente de la mayoría de palinomorfos: dinoflagelados, acritarcos, esporas y polen. Está también presente en algunas algas. Esta es una sustancia muy interesante, probablemente el compuesto orgánico conocido más resistente. Esta resiste la acetólisis, pero es degradada por oxidantes fuertes, tales como el H_2O_2 y el HNO_3 [¡Error! Marcador no definido.].

Traverse enuncia que “fue primero observada y llamada (como “esporonin”) por John en 1814 y caracterizada por Berzelius en 1830. Mucho después, Zetsche, Kalin y Zetsche en 1931 establecieron una fórmula empírica aproximada de $C_{90}H_{142}O_{27}$ ” [¡Error! Marcador no definido.].

La determinación de la estructura de la esporopolenina es muy difícil ya que los

procedimientos utilizados para aislar la molécula la transforman químicamente, por ejemplo la monoetanolamina la oxida produciendo azúcares simples y otros compuestos que no proveen la estructura de la molécula original. Además, las técnicas de preparación usadas para remover los otros constituyentes de las esporas y del polen (KOH y acetólisis) también cambian la esporopolenina, esta tiene una marcada tendencia de aceptar halógenos, iones metálicos y otros grupos. Espectros de infrarrojo mostraron que la esporopolenina contiene en su estructura la sal de potasio del ácido glucurónico [¡Error! Marcador no definido.].

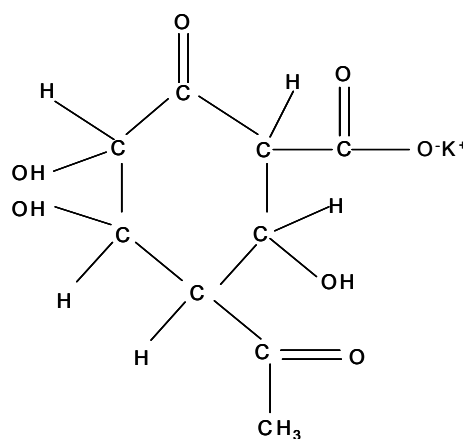


Figura 2. Fórmula estructural del ácido glucurónico

Según Traverse “Shaw *et al.*, Heslop-Harrison y Brooks *et al.* han sugerido que la esporopolenina es un copolímero de β -caroteno y ácidos grasos. De ser verdadero, la sustancia debería tener unidades repetitivas de una clase de isoprenoide. Given en 1984 notó que la predominancia de cadenas directas sobre la estructura isoprenoide en paredes de esporas fósiles hacía difícil aceptar la teoría de Brooks *et al.* Given *et al.* en 1985 notaron la presencia de cadenas alifáticas con poca o ninguna bifurcación en las muestras de esporopolenina moderna, así como la considerable variabilidad estructural en muestras de grupos de plantas diferentes. Potonié & Rehnelt en 1971 sugirieron la siguiente unidad estructural [¡Error! Marcador no definido.].”

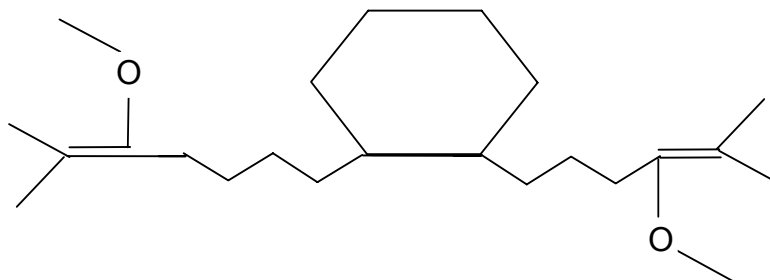


Figura 3. Unidad estructural sugerida para la esporopolenina [¡Error! Marcador no definido.].

Esta unidad estructural convertiría a la esporopolenina en un compuesto parecido al caucho. Estos compuestos comparten mucho en común: elasticidad, sensibilidad a la oxidación y alcalinidad, y “durabilidad” general. Sin embargo, la estructura del caucho no contiene oxígeno [¡Error! Marcador no definido.].

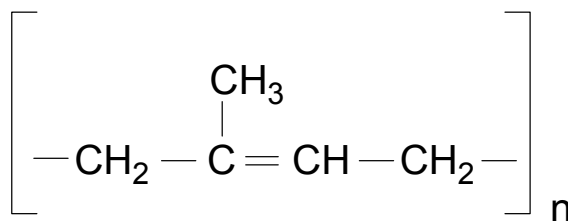


Figura 4. Estructura del caucho

La forma estructural como la esporopolenina aparece en esporas y polen es muy diversa. En general está limitada a la pared externa, la exina. Algunas plantas florecidas en su mayoría acuáticas no producen esporopolenina, y otras, por ejemplo, la familia *Lauraceae*, tienen muy poca en sus exinas, indicando que estas exinas raramente son preservadas como fósiles.

La historia evolutiva de la esporopolenina es muy larga. Los acritarcos con esporopolenina aparecieron en rocas del periodo Precámbrico de 1,2 – 1,4 billones de años de edad. En estos organismos, la esporopolenina jugó el papel de protector del protoplasma en contra de la radiación ultravioleta. Las algas verdes son presumiblemente las responsables del desarrollo de la esporopolenina y su introducción en la estructura de las plantas superiores, donde su principal función era la protección de la oxidación y desecación.

La esporopolenina es un compuesto muy estable, probablemente un polímero de las especies carotenoides-terpenoides. Su color natural es amarillo pálido, pero con la maduración termal, la esporopolenina presenta una disminución de oxígeno e hidrógeno y un incremento del porcentaje de carbono, y el color puede variar del amarillo oscuro, naranja, marrón rojizo y finalmente al negro.

Los agentes de la maduración termal son la elevación de la temperatura y el tiempo. Se ha notado que el polen se oscurece lentamente a los 100°C y más rápidamente a los 150° y 200°C. A los 150°C por períodos muy largos las exinas se oscurecen [¡Error! Marcador no definido.].

La esporopolenina tiene una gravedad específica de 1,4 aproximadamente, un índice de refracción de 1,48 y es menos sensible a la oxidación que la mayoría de la materia orgánica presente en sedimentos. También es sensible al pH alto por

prolongados periodos de tiempo. Las enzimas en su mayoría no afectan a la esporopolenina, de esta manera las exinas del polen y las esporas atraviesan inalteradas la mayoría de los intestinos animales (incluyendo humanos), aunque el contenido de los granos es digerido [¡Error! Marcador no definido., 3].

Algunos hongos pueden digerir esporopolenina y pueden atacar esporas y polen, aparentemente luego de la deposición en sedimentos. La esporopolenina se “disuelve” en 1-etanolamina (monoetanolamina), especialmente si las exinas son pretratadas por acetólisis [¡Error! Marcador no definido.].

Desde el punto de vista paleopalinológico, las propiedades de la esporopolenina, garantizan que los palinomorfos presentes en un sedimento, tiendan a permanecer en él, aunque su contenido y otras capas de su pared sean degradadas.

En la formación de un sedimento, los factores anteriores y los posteriores a la deposición que pueden destruir la esporopolenina son [¡Error! Marcador no definido., 3]:

- a) ambiente oxidante,
- b) ambiente altamente alcalino,
- c) la carbonización (coalificación o maduración termal, como resultado de la relativamente lenta elevación de la temperatura a través de un largo tiempo),
- d) alta temperatura (durante un corto tiempo, como resultado, por ejemplo, de la intrusión volcánica),
- e) la recristalización de los minerales en los sedimentos.

2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA ESPOROPOLENINA

Diferentes técnicas geoquímicas analíticas han sido usadas para investigar los cambios químicos que ocurren en la esporopolenina durante la maduración termal. Análisis infrarrojo y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C muestran una disminución del contenido alifático y de los grupos funcionales con oxígeno, así como el aumento de la aromaticidad con el incremento de la maduración termal.

Sin embargo, estos estudios usaron muestras maduras artificialmente, calentadas en condiciones diferentes a las que ocurren en ambientes geológicos [4].

Recientemente, algunas técnicas analíticas han sido avaladas para la caracterización química del polen y de las esporas. Estas son: espectroscopía

infrarroja con transformada de micro-Fourier y rayos X [4].

Según Yule, Roberts y Marshal “Cody *et al.* en 1996 sugirieron que la evolución estructural de la esporopolenina durante la alteración termal involucran secuencialmente una deshidratación, una ciclo-adición de Diels Alder, una deshidrogenación y una progresiva aromatización del biopolímero” [4].

2.1. EVIDENCIA QUÍMICA

Estudios de difracción de rayos X, de infrarrojo y la espectroscopía de RMN ¹³C sobre polímeros naturales y sintéticos confirman la estructura química de la esporopolenina como un polímero oxidativo de carotenoides y ésteres carotenoides [5].

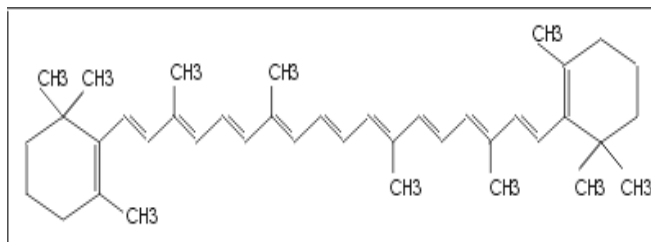


Figura 5. Fórmula estructural del β-Caroteno

2.2. EVIDENCIA CITOQUÍMICA

La esporopolenina contiene grupos alifáticos con dobles enlaces. El polímero absorbe la luz ultravioleta (290, 265 y 250 nm) y por fluorescencia sugiere la presencia de dobles enlaces C-C conjugados adyacentes a grupos C-O. También tiene grupos aniónicos débiles tales como compuestos ácido-enólicos. La oxidación de la estructura de carotenos conduce a la formación de grupos enólicos dentro de las largas cadenas de carbono alifáticas [5].

2.3. ESTUDIOS GEOQUÍMICOS DE LA ESPOROPOLENINA

Considerando la evidencia experimental, hay dificultades en el entendimiento total de los diversos parámetros que pueden afectar los cambios químicos y de color en el polen y las esporas, parece que tales cambios ocurren por los procesos de coalificación y carbonización. Los procesos dependen de las diferentes velocidades de calentamiento, de los distintos tiempos de alteración termal y de las reacciones químicas. *Las alteraciones termales* son consideradas el parámetro

más importante, pero es necesario considerar los efectos de los gradientes de la presión en regiones sujetas a enterramientos profundos [5].

Bajo procesos de carbonización las paredes del polen y esporas muestran cambios químicos y de color que empiezan a temperaturas entre los 100° y 200°C. Sobre los cambios progresivos que ocurren con el calentamiento secuencial del polen y las esporas poco se sabe, pero algunos resultados sugieren que el polen y las esporas carbonizan a diferentes temperaturas dependiendo de su historia geotermal.

Cuando las paredes de polen y esporas son calentadas a bajas temperaturas (menores que 180°C) se produce emanación de pequeñas cantidades de metano y CO₂, y el residuo de la esporopolenina aparece muy poco alterado. La esporopolenina calentada a altas temperaturas (mayores que 220°C), produce más productos químicos volátiles y solubles y muestra alteraciones significativas en los cambios químicos y de color en un tiempo relativamente corto [5].

2.4. CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA ESPOROPOLENINA

Para el estudio de los cambios en la estructura química se utilizaron muestras de esporas y polen fosilizadas y muestras artificialmente maduradas, las cuales fueron calentadas por un periodo de 60 horas hasta los 300°C.

Esporopolenina no fosilizada.

Estudios de ¹³C-RMN indican que la esporopolenina contiene en su estructura hidrocarburos alifáticos (10-50 ppm), grupos alifáticos oxigenados (50-105 ppm), carbonos insaturados (110-160 ppm) y grupos carboxilo (160-180 ppm) [6].

Esporopolenina fósil. (Análisis FT-IR de muestras naturalmente maduradas).

- Durante las fases tempranas de la maduración.

Las esporas y el polen progresivamente se oscurecen a través de una serie de colores en el rango del amarillo pálido al naranja.

Los cambios químicos ocurridos durante la fase inmadura involucra una reducción de los grupos C=O y un incremento de los grupos alifáticos -CH₂,-CH₃ y enlaces C=C (asociados con anillos aromáticos).

- Durante la fase madura.

Los constituyentes químicos de las esporas y del polen fueron termalmente craqueados para generar hidrocarburos. Datos de FT-IR muestran la disminución

de una porción considerable de los grupos alifáticos y un incremento en el contenido C=C asociado con la formación de anillos aromáticos.

El polen y las esporas exhiben rápidos cambios de color, que van del naranja hasta el marrón.

Además el incremento en la madurez es reflejado con el rápido aumento en la reflectividad (pero poco cambio de color). Esto es debido a la formación de múltiples unidades aromáticas.

Esto muestra que un cambio fundamental en el esqueleto molecular ocurre en la espora, los enlaces C-H y C-C se rompen y son reemplazados por enlaces insaturados y anillos aromáticos [4].

- Durante la fase pos-madura.

Todas las esporas y polen son de color negro. Los palinomorfos todavía retienen algo de los grupos $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ y $\text{C}=\text{O}$ dentro de su estructura. La aromatización y el crecimiento de unidades poliaromáticas se muestra con el incremento en la intensidad de la banda aromática [4].

Esporopolenina fósil oxidada.

Algunas muestras fueron oxidadas por tratamiento con HNO_3 concentrado con KClO_3 saturado (solución de Schulze) por 30 minutos. El espectro de ^{13}C mostró una significativa disminución del material aromático. Ácido benzoico fue recuperado de la solución oxidada, el cual es una derivación común del contenido aromático de la esporopolenina.

Según Yule, Roberts y Marshall "Saxby en 1982 sugirió que el cambio del color amarillo al naranja en las esporas representa el rompimiento de los grupos carboxilo en ácidos y esteres y el negro ocurre en el punto donde los enlaces de carbono alifáticos y aromáticos se rompen para formar metano. Sin embargo, no hay análisis químicos donde se intenten verificar estas hipótesis" [4].

3. MADURACIÓN TERMAL DE LA ESPOROPOLENINA

El proceso de coalificación de la materia orgánica en rocas sedimentarias por la alteración termal puede ser llamado catagénesis. Con mayor precisión se refiere como diagénesis al cambio termal hasta 50°C (R_o : 0,5 - 2), en el rango de 150°C - 250°C como metagénesis (R_o : 2 - 4) y alrededor de los 250°C como metamorfismo (R_o cerca de 4). R_o es una medida de reflectancia.

Los principales propósitos para usar el estado de carbonización del material orgánico dispersado en rocas sedimentarias es predecir el potencial de hidrocarburos de las rocas. Petrologistas orgánicos miden la reflectancia de materia orgánica dispersada especialmente preparada, más a menudo con partículas de vitrinita que de exinita. Sin embargo, el color de los palinomorfos en preparaciones es útil como una medida de la carbonización. Según Traverse "Batten (1980) sugiere la escala de siete puntos dada en la Tabla 1".

Esta puede ser comparada con la tabla de color de Pearson (Tabla 2), en la que el color está directamente relacionado con el índice de maduración termal numérico (TAI) [¡Error! Marcador no definido.].

Tabla 1. Escala de color para palinomorfos [¡Error! Marcador no definido.].

COLOR OBSERVADO DE LOS PALINOMORFOS	SIGNIFICADO
(1) Color claro, amarillo pálido, naranja amarillento	Cambio químico negligible; materia orgánica inmadura, no tiene una fuente potencial de hidrocarburos
(2) Amarillo	Algún cambio químico, pero materia orgánica levemente inmadura
(3) Amarillo-marrón claro, naranja amarillento	Algún cambio químico, materia orgánica madura pero probablemente no tiene potencial como una fuente comercial
(4) Marrón medio claro	Materia orgánica madura, volatilización activa, generación de combustible
(5) Marrón oscuro	Materia orgánica madura, producción de gas húmedo y condensado, transición a la fase de gas seco
(6) Marrón-negro muy oscuro	Materia orgánica sobremadura; fuente potencial para gas seco
(7) Negro (opaco)	Trazas de gas seco

Este tipo de estándares pueden proveer consistencia para realizar determinaciones del color subjetivo relacionadas con la madurez termal orgánica. Estos estándares son avalados por todos los especialistas que trabajan con la microscopía de color [1].

4. PROCESAMIENTO PALINOLÓGICO

El procesamiento palinológico de rocas sedimentarias para el estudio microscópico es usualmente realizado por medio de procedimientos estándares que involucran la extracción de la materia orgánica de las rocas por digestión de carbonatos y silicatos con los ácidos (HCl y HF respectivamente). En el estudio, el residuo orgánico extraído es fraccionado por tamizado (usualmente a través de un tamiz de 20-25 μm). El fraccionamiento ayuda a obtener un mejor y fácil estudio palinológico de las muestras. En muestras ricas en compuestos orgánicos, mejores muestras palinológicas son a veces obtenidas por una corta oxidación para remover la materia orgánica en exceso. Sin embargo, la oxidación puede causar la disolución y eliminación completa de los palinomorfos [1, 7].

Tabla 2. Coloración de la exina de esporas y polen con maduración geotermal (“coalificación”). TAI: índice de alteración termal [¡Error! Marcador no definido.].

MADUREZ TERMAL ORGÁNICA	COLOR DE ESPORAS Y POLEN FÓSIL	TAI 1-5	Reflectancia vitrinita	RANGO CARBON	FLUORESCENCIA : CANTIDAD Y COLOR
Inmadura		1	0,2%	Turba	Alta a media; Azul-verde
		1+		Lignita	Alta a media; Verde-blanco
		2-	0,3%	Sub-bituminoso	Alta a media; Verde-blanco
Fase madura de la generación del petróleo líquido		2	0,5%		Bituminoso, Volumen Alto
		2+		Alta a baja; Amarillo	
		3-	0,9%		
		3			
Gas seco condensado a estéril		3+	1,3%	Bituminoso, Volumen Medio	Baja: amarillo oscuro a naranja-marrón
		4-	2,0%	Bituminoso, Volumen Medio	No fluorescencia de las exinas de polen y esporas
		4	2,5%	Semi-antracita	
	5		Antracita		

4.1. LA OXIDACIÓN EN PROCESOS PALINOLÓGICOS.

Los palinomorfos alterados termalmente son usualmente tratados con un agente oxidante. Los oxidantes mas comúnmente usados son ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio o el reactivo de Schulze. El objetivo principal de este procedimiento es transformar parcialmente restos orgánicos en ácidos húmicos que pueden ser disueltos con álcali (por ejemplo carbonato de potasio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio e hidróxido de amonio). Los oxidantes también pueden disminuir el color de los palinomorfos carbonizados. Si la esporopolenina ha sido irreversiblemente alterada, los palinomorfos pueden ser destruidos durante la oxidación debido a la carencia de protección de las macromoléculas integradas.

El tipo de tratamiento y duración depende del grado de oxidación natural, de la estructura de los palinomorfos (por ejemplo la delicada ornamentación y la pared gruesa o delgada), y de la alteración termal de los palinomorfos.

4.1.1. Técnica con hidróxido de potasio

El procedimiento usual es calentar el polen en KOH al 10%. El KOH es uno de los reactivos estándares usados para liberar polen y en el estudio de muestras con contenido de materia orgánica, sin embargo placas de referencia han mostrado una considerable destrucción del polen [8].

4.1.2. Técnica de acetólisis

Según Brown "G. Erdtman y H. Erdtman en 1933 reportaron una técnica para la liberación del polen, basados en el concepto de que la fracción de celulosa puede ser hidrolizada a glucosa y la fracción de lignina puede ser destruida por oxidación "[8]. La acetólisis es un proceso de descomposición con la adición de ácido acético, consiste en una acetilación e hidrólisis simultánea.

La materia que acompaña al polen, bien sea procedente de herbario fresco o fósil, son generalmente restos vegetales como flores y hojas cuyo componente principal es la celulosa, que se destruye por el líquido acetolítico. Por esta razón la acetólisis es uno de los mejores métodos de laboratorio para purificar las muestras [9].

4.1.3. Técnica con peróxido de hidrógeno

Como Brown reporta "P. W. Thomson sugirió al H_2O_2 como un agente oxidante, clareador y al mismo tiempo dispersante; útil para oxidar muestras oscuras con alto grado de carbonización" [88, 10].

4.1.4. Combinaciones con ácido nítrico

Dependiendo de la edad de las muestras, la concentración del HNO_3 varía. Las más usadas son las siguientes:

Plioceno y Mioceno	HNO_3 35%
Eoceno y Paleoceno	HNO_3 40%
Cretáceo	HNO_3 45%
Paleozoico	HNO_3 67%

Según la proporción de los reactivos mencionados, cada solución tiene un nombre específico:

Solución de Schulze: La más comúnmente utilizada en la preparación de palinomorfos, consiste en tres partes de HNO_3 y una de solución sobresaturada de $KClO_3$ [10, 11].

Solución de Luber: 56 mL de HNO_3 a 88 mL de solución sobresaturada de $NaCl$ [10].

Técnica de Zetsche: Usada para separar microesporas y megasporas. Consta de 3 mL de bromo puro y 10 mL de HNO_3 [10].

4.1.5. Otras técnicas de oxidación

Como Jansonius y McGregor reportan "Jones en 1944 oxidó satisfactoriamente kerógeno en recipientes sellados usando un tratamiento de microondas, notando que la concentración y el volumen del agente oxidante, la cantidad de kerógeno y la duración del calentamiento son factores críticos para utilizar esta técnica. En 1994 Jones reportó una técnica más efectiva y segura utilizando un "magnetron enfocado" a presión atmosférica, por la cual el material bituminoso o el aceite de aditivos fangosos, fueron disueltos en el reactivo de Schulze en 10-15 minutos" [9].

Eshet y Hoek en 1996 utilizaron una solución de $NaOCl$ al 10%, para oxidar selectivamente el exceso de restos orgánicos. Anteriormente, el $NaOCl$ había sido sugerido por Erdtman en 1933 y Gray en 1965 como un oxidante útil, pero no

dieron los detalles del período de oxidación requerido y los problemas del procesamiento de muestras con alto contenido orgánico [11;Error! Marcador no definido.].

5. APLICACIONES DE LA PALINOLOGÍA

Los palinomorfos representan parte de los ciclos de vida de diferentes plantas y animales, como consecuencia estos son característicos de un tiempo bastante específico y por esto son útiles para la datación (geocronología).

Aproximadamente desde hace 40 años son un instrumento poderoso para la correlación estratigráfica y para datar sedimentos e integrar secuencias marítimas y no marítimas. Este trabajo de correlación bioestratigráfica (en este caso, palinoestratigráfica) es el que en su mayor parte realizan palinólogos de compañías petroleras.

Los palinomorfos pueden ser indicadores sensitivos de los procesos de sedimentación y la fuente de los sedimentos. Algunos como los dinoflagelados, son organismos marinos y pueden ser indicadores del ambiente biológico de los organismos cuando vivían. Como las plantas son indicadores sensitivos de ambientes continentales (sobre todo climas), las esporas y el polen tienen mucho que decir acerca de los paleoambientes climáticos [;Error! Marcador no definido.].

El estudio de los granos de polen, recientes y antiguos, pueden ser de gran valor en los estudios científicos. Estos incluyen:

1. Taxonomía.
2. Estudios genéticos y de evolución.
3. Ciencia forense.
4. Estudios de alergias.
5. Reconstrucción de la historia vegetal en:
 - a) Especies individuales;
 - b) Comunidades.
6. Correlación de depósitos y asignación de datos tentativos.
7. Estudio de los cambios climáticos.
8. El estudio del impacto pasado humano sobre la vegetación.

Hay varios rasgos que poseen los granos de polen y las esporas, que los han

convertido en útiles en todas las disciplinas. En primer lugar ellos tienen una capa externa resistente (la exina), la cual hace que sobrevivan mejor y por más tiempo que otros materiales biológicos. La química de la exina hace que ellos resistan el deterioro y cualquier actividad microbiana, que sean capaces de soportar la humedad, la salinidad y a la baja disponibilidad de oxígeno o su ausencia. Esto es de particular valor en el estudio de la historia vegetal y su aplicación en campos como la datación y la climatología.

El segundo rasgo útil es la variación en la forma y escultura de la capa resistente. Tales variaciones en la forma proveen un medio de identificación de los granos de polen y son también un carácter importante para usar en los estudios taxonómicos.

El pequeño tamaño de los granos de polen y las esporas es necesario para facilitar su transporte en el movimiento del material genético (polen) o en la colonización de un territorio nuevo (esporas). Muchos cuentan con transporte aéreo para su diseminación y el estudio de su movimiento puede ser de interés para investigadores de genética y para científicos médicos que estudian las causas de las reacciones alérgicas [12].

Una aplicación extensamente utilizada en la exploración de hidrocarburos, es la estimación de la madurez termal (o índice de alteración termal, TAI) del color de las paredes de la espora. La materia orgánica dispersada (kerógeno), incluyendo paredes de esporas, coalifica a una velocidad similar a los carbones cuando están sujetos al incremento de la temperatura. El cambio en el color de la exina no oxidada de amarillo pálido a naranja, marrón y negro, es una medida útil de la carbonización que puede ser correlacionada con los valores de la reflectancia de los carbones. Varias escalas de color de esporas son usadas (ver Tabla 2). La maduración termal puede ser observada en luz ultravioleta usando microscopía de fluorescencia. Propiedades autofluorescentes de la exina han sido relacionadas a las fases de generación de los hidrocarburos [9].

6. ADOBE PHOTOSHOP 7.0

Photoshop es una aplicación para computadoras Macintosh que permite editar y modificar fotos y figuras.

6.1. EL MODELO DE COLOR RGB

Los monitores de computadora se componen de puntos o unidades individuales, comúnmente llamadas píxeles. Estos puntos están colocados en renglones y columnas, como una rejilla o retícula. Cada píxel puede tener cualquier valor de una gama de más de 16 millones de colores.

Los dispositivos como el monitor de la computadora están diseñados para funcionar bajo el modelo de color RGB, siendo el rojo (**R**ed), verde (**G**reen) y azul (**B**lue) los colores conocidos como primarios aditivos. En el espectro RGB, cada color consiste en tres números (uno para el rojo, otro para el verde y el último para el azul) que indican el porcentaje de cada color. Las diferentes mezclas y proporciones de estos colores primarios generarán los distintos colores [13].



Figura 6. Modelo de color RGB

6.2. EL MODELO DE COLOR CMYK

Existen diversos modelos de color, otro de los más conocidos es el modelo CMYK (**C**ian, **M**agenta, **A**marillo y **N**egro) o cuatricromía. Al contrario del modelo RGB, éste modelo es conocido como el modelo de color substractivo y es muy utilizado para la impresión en color y en las impresiones y transparencias fotográficas en color.

El modelo de color aditivo simula el espectro visible del color sumando la luz de tres colores primarios, mientras que el modelo de color substractivo se basa en el hecho que diferentes pigmentos absorben diferentes longitudes de onda de la luz, con lo que los colores se producen restando y no sumando. Es decir, el modelo CMYK aprovecha las cualidades de absorción de las tintas y el soporte [13].

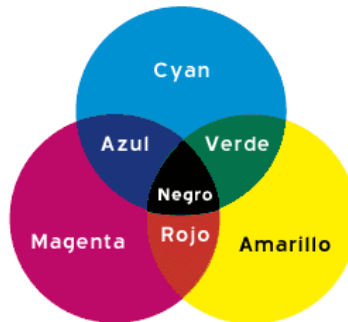


Figura 7. Modelo de color CMYK

7. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

Método estadístico para comparar simultáneamente más de dos medias de población. Produce conocimientos más precisos sobre las oscilaciones o variaciones de un fenómeno, puesto que descompone su varianza total en la varianza de cada uno de los diferentes factores que lo componen. En consecuencia, la variación total puede dividirse en las partes o fuentes que fundamentalmente, lo producen, donde cada parte mide la variabilidad atribuible a alguna fuente específica [14].

7.1. VARIACIÓN TOTAL

Toma la desviación de cada observación de muestra X_{ij} con respecto a la media total \bar{X} , elevando al cuadrado $(X_{ij} - \bar{X})^2$ y luego sumando las desviaciones al cuadrado de todas las observaciones en el experimento.

$$Q = \sum_j \sum_i (X_{ij} - \bar{X})^2$$

Ecuación 1.

Donde:

Q : Variación total

$\sum_j \sum_i$: Todas las combinaciones i y j .

La variación total se conoce también como la suma total de los cuadrados y puede ser subdividida en partes [1414].

7.1.1. Variación dentro de tratamientos

La variación dentro de tratamientos se calcula trabajando con cada muestra de un tratamiento por separado. Para cada tratamiento, digamos el j tomamos la desviación de cada observación de muestra X_{ij} con respecto a la media del tratamiento \bar{X}_j , elevamos al cuadrado la desviación $(X_{ij} - \bar{X}_j)$ y se suman las desviaciones al cuadrado $(X_{ij} - \bar{X}_j)^2$. Después se suman estos totales $\sum_i (X_{ij} - \bar{X}_j)^2$ para todos los tratamientos, con objeto de:

$$Q_1 = \sum_j \sum_i (X_{ij} - \bar{X}_j)^2 \quad \text{Ecuación 2.}$$

Q_1 : Componente dentro de tratamientos de la variación total, conocida también como suma de los cuadrados dentro de tratamientos.

7.1.2. Variación entre los tratamientos

Mide la variabilidad de las medidas de las muestras de los tratamientos. Se suma la desviación de la media de cada tratamiento \bar{X}_j con respecto a la media total $\bar{\bar{X}}$, se eleva al cuadrado $(\bar{X}_j - \bar{\bar{X}})$ y ponderamos cada una por el tamaño de la muestra (denotado por n), puesto que estas desviaciones al cuadrado se refieren a desviaciones de medias de muestra. Luego sumamos para todos los tratamientos.

$$Q_2 = \sum_j n(\bar{X}_j - \bar{\bar{X}})^2 \quad \text{Ecuación 3.}$$

Q_2 : Variación entre tratamientos, conocida también como suma de los cuadrados entre tratamientos.

Media de los cuadrados

Se obtiene cuando se divide una suma de cuadrados por sus respectivos grados de libertad.

$$\frac{MS_1}{\delta_1} = \text{Media de los cuadrados dentro de tratamientos.} \quad \text{Ecuación 4.}$$

$$\frac{MS_2}{\delta_2} = \text{Media de los cuadrados entre los tratamientos.} \quad \text{Ecuación 5.}$$

Desarrollo de la estadística de prueba

En el experimento se espera comprobar una de las siguientes dos conclusiones:

$$C_1 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_n \quad \text{Ecuación 6.}$$

$$C_2 = \mu_1, \mu_2 \text{ y } \mu_n \text{ no son iguales} \quad \text{Ecuación 7.}$$

MS_1 estima la variabilidad inherente en los datos de la muestra independientemente de si las μ (medias) son iguales, esto es, de si se sostiene o no C_1 . Esto, no es la misma situación para MS_2 . La teoría estadística demuestra que si se sostiene C_1 , entonces MS_2 también es una estimación de la misma variabilidad inherente que la estimada por MS_1 .

Si se sostiene C_2 , MS_2 estima la suma de los dos componentes:

- 1). la misma variación inherente que está estimada por MS_1
- 2). Una componente adicional de variación en los datos debido a las diferencias entre tratamientos.

Se desea concluir C_1 o C_2 comparando MS_2 y MS_1 , usando la razón, V_2

$$V_2 = \frac{MS_2}{MS_1} \quad \text{Ecuación 8.}$$

Si las medias de los tratamientos son iguales, MS_1 y MS_2 son una estimación de la misma variabilidad inherente del muestreo y los dos deben ser aproximadamente iguales. Por lo tanto, V_2 será cercano a 1. Si las medias de los tratamientos son desiguales, MS_2 reflejará la variación en las medias de los tratamientos así como la variación inherente al muestreo, mientras que MS_1 reflejará solamente la variación inherente al muestreo. En consecuencia, MS_2 deberá tender a ser más grande que MS_1 y V_2 tenderá a ser mayor que 1.

Distribución de la estadística de prueba si se sostiene C_1

La técnica estadística más comúnmente usada para tomar decisiones acerca de las medias de varias poblaciones, nos lleva por si misma, a controlar el error Tipo

1, el error de concluir C_2 , cuando de hecho C_1 es la conclusión correcta. Por lo tanto, se necesita saber la distribución de la estadística de prueba V_2 , si se sostiene C_1 , de tal manera que se pueda controlar un error tipo 1.

La teoría estadística muestra que si se sostiene C_1 y prevalecen ciertas condiciones adicionales, V_2 está distribuida de acuerdo a una distribución F.

Propiedades de las distribuciones F

Son una familia de distribuciones continuas, unimodales y asimétricas hacia la derecha. La escala varía desde cero hasta infinito. Puesto que la distribución F es una distribución de probabilidades, las áreas bajo esta distribución indican probabilidad. Existe una distribución F separada para cada par de valores de parámetros δ_2 y δ_1 .

Si V_2 es menor o igual al valor crítico conocido como A de la distribución F al nivel de significación escogido, C_1 se concluye y si V_2 es mayor que A, C_2 se concluye, donde el límite de acción A quede determinado por la distribución F pertinente de acuerdo al riesgo especificado de cometer un error tipo 1 [1414, 15, 16].

La variable continua del análisis recibe el nombre de *variable dependiente*. Las categóricas que definen los grupos suelen llamarse *variables independientes o explicativas* o, más comúnmente *factores*. Los posibles valores que puede tomar un factor reciben el nombre de *niveles*, y cada posible combinación de los niveles de los distintos factores en estudio se llama *tratamiento*. Al efecto que se produce cuando la influencia de un factor sobre la variable dependiente es diferente según los distintos niveles de otro factor se le conoce como *interacción* entre ambos factores.

El modelo ANOVA descompone la variabilidad total de la variable dependiente en componentes independientes que pueden ser atribuidas a distintas causas (factores e interacciones). El diseño del experimento en cuestión determinará el modelo matemático y la descomposición de la varianza a aplica [17].

7.2. MODELO DE DOS FACTORES

Se utiliza para estudiar simultáneamente el efecto de dos o más factores sobre la variable dependiente.

El modelo plantea un contraste de hipótesis para el cual la hipótesis nula es la igualdad de medias entre las subpoblaciones que definen los distintos niveles de cada factor. Se calcula entonces el valor de un estadístico (F) cuyo valor, de ser cierta la hipótesis nula, se sabe que proviene de una distribución F de Fisher-

Snedecor. La probabilidad de obtener bajo esa distribución un valor igual o mayor que el resultante aparece en la tabla del análisis de varianza como *valor-p*.

Si el valor obtenido es compatible con la hipótesis nula (*valor-p*>0.05) se concluirá que los datos no aportan evidencia de que las medias poblacionales sean diferentes y el análisis habrá concluido.

En caso contrario se rechazará la hipótesis nula y se aceptará, por lo tanto, que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El valor de *valor-p* podrá ser interpretado en tal caso como la probabilidad de existir una equivocación. Es habitual utilizar como valor límite el 0,05, que proporciona un nivel de confianza del 95% [17].

7.3. USO DE LA COMPUTADORA PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO

La computadora al operar grandes volúmenes de datos es una gran ayuda en el análisis estadístico descriptivo. Se pueden utilizar varios programas estadísticos para organizar, resumir y caracterizar información cuantitativa, y para presentar en forma tabulada y de gráficas tanto la información cuantitativa como la cualitativa [18].

7.3.1. Paquete estadístico STATGRAPHICS

Al aprender a utilizar un paquete estadístico, como STATGRAPHICS se tiene la posibilidad de aprovechar este reciente progreso tecnológico y apreciar la ayuda que puede brindar una computadora para solucionar problemas estadísticos en especial los que incluyen un gran número de variables o grandes volúmenes de datos. La computadora es una herramienta en extremo útil que puede almacenar, organizar y procesar información con facilidad y rapidez y proporcionar resultados, tablas y gráficas resumidas. No obstante, se debe tener en cuenta que la computadora es sólo una herramienta.

Para interactuar en forma apropiada con la computadora, no sólo se tiene que estar familiarizado con el paquete de programas en uso, sino que además se tiene que seleccionar correctamente los procedimientos estadísticos apropiados para la tarea que se va a realizar [18].

II. PARTE EXPERIMENTAL

Los palinomorfos que se utilizaron fueron extraídos de rocas provenientes del área de la formación Rosa Blanca, ubicada en el municipio de Zapatoca, Santander. Luego fueron sometidos a varios tratamientos de oxidación con el fin de decolorarlos para facilitar su observación microscópica y clasificación. Esto es un aspecto importante para facilitar la datación de los pozos petroleros.

1. EXTRACCIÓN DE PALINOMORFOS

La extracción de los palinomorfos consistió en la disgregación de la roca, luego en la eliminación de los carbonatos, de los silicatos y en la separación por diferencia de densidades de la materia orgánica del resto de la muestra.

- *Disgregación.*

Con la ayuda de un mortero de hierro previamente lavado y completamente seco se trituraron 30 g de roca, dejándola con un tamaño de partícula entre 1 y 2 mm de diámetro aproximadamente. Este procedimiento se realizó en un lugar libre de la presencia de reactivos y de otras muestras de roca, con el fin de evitar la contaminación química.

- *Eliminación de carbonatos.*

A los 30 g de roca triturada se les agregó 30 mL de ácido clorhídrico al 39% y se dejó en reposo por 45 minutos con el fin de eliminar los carbonatos [19]. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 1000 rpm. El líquido sobrenadante se eliminó y al precipitado se le agregó agua destilada para volver a centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm. Este paso se realizó tres veces con el fin de disminuir la acidez de la muestra.

- *Eliminación de los silicatos.*

El precipitado del proceso anterior se transfirió a un vaso de precipitados y se le agregó 30 mL de ácido fluorhídrico 60% y se dejó en reposo por 15 horas con el fin de eliminar los silicatos. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. El líquido sobrenadante se eliminó y al precipitado se le agregó agua destilada para volver a centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm. Este paso se realizó tres veces con el fin de disminuir la acidez de la muestra.

- *Separación con líquidos pesados.*

Al precipitado del proceso anterior se le agregó 20 mL de $ZnCl_2$ (densidad: $2g/cm^3$) y se homogenizó con una varilla de agitación, desprendiendo los restos de la muestra adheridos a las paredes del tubo. Posteriormente se centrifugó por 45 minutos a 3000 rpm. Como resultado se obtuvieron 2 fases, la fase menos densa se filtró en un papel de filtro marca Nitex de 10 μm . Este filtrado fue lavado con agua destilada. El residuo sólido corresponde a los palinomorfos [20]. Estos palinomorfos se disolvieron en 6 mL de agua, se almacenaron en frascos de vidrio con tapones de caucho y posteriormente se utilizaron para los tratamientos oxidativos. En total se realizaron 15 extracciones de palinomorfos de la roca.

2. PREPARACIÓN DE LOS PALINOMORFOS PARA LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Las soluciones preparadas en el proceso anterior se homogenizaron y se tomaron 3 gotas y se distribuyeron uniformemente sobre una laminilla cubreobjetos, a la que se le había colocado 1 gota de alcohol polivinílico. Esta laminilla se colocó en una plancha de calentamiento a $60^\circ C$ durante 15 minutos para facilitar la evaporación del agua y la fijación de los palinomorfos.

Luego la laminilla se fijó a la lámina portaobjetos utilizando bálsamo del Canadá y se eliminaron las burbujas haciendo presión suave con un par de palillos [10, 21].

Las placas se limpiaron con xileno y papel absorbente para retirar el exceso del bálsamo del Canadá y se rotularon. Posteriormente se valoró el estado de maduración de los palinomorfos, que consistió en observar el color de los palinomorfos en un microscopio Olympus Cx 21. A estas placas se les tomaron fotografías que luego fueron analizadas con el software Adobe Photoshop 7.0. Los datos de coloración obtenidos fueron posteriormente analizados estadísticamente.

3. OXIDACIÓN DE LOS PALINOMORFOS

Después de valorar el estado de maduración termal de los palinomorfos se sometieron a la acción de diferentes oxidantes con el fin de aclarar su coloración. Se utilizaron, inicialmente la solución de Schulze y ácido nítrico al 65%, oxidantes empleados en el ICP. Puesto que el cambio de coloración obtenido con estos oxidantes no fue aceptable, se utilizaron otros oxidantes. El procedimiento seguido se describe a continuación:

3.1. Solución de Schulze [8].

- A cuatro tubos de ensayo se adicionaron 0,5 mL de palinomorfos en cada uno y 3 mL de solución de Schulze (ácido nítrico al 65% y solución sobresaturada de clorato de potasio 3:1) y se dejaron en baño maría por 10, 20, 30 y 40 minutos respectivamente con agitación constante.
- Posteriormente, se adicionaron 6,5 mL de agua destilada a cada uno de los tubos de ensayo y se centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm.
- Finalmente se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido de cada uno de los tubos de ensayo en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones y se lavó con agua destilada.

3.2. Ácido nítrico al 65*.

- A cuatro tubos de ensayo se adicionaron 0,5 mL de palinomorfos en cada uno y 0,5 mL de HNO₃ al 65% y se dejaron en baño maría por 10, 20, 30 y 40 minutos respectivamente con agitación constante. Posteriormente, se adicionaron 9 mL de agua destilada a cada uno de los tubos de ensayo y se centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm.
- Finalmente se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido de cada uno de los tubos de ensayo en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones y se lavó con agua destilada.

3.3. OTROS OXIDANTES

Teniendo en cuenta que el tratamiento de los palinomorfos con la solución de Schulze y el ácido nítrico al 65% no produjo cambio apreciable en la coloración de estos, se evaluó el efecto de otros oxidantes consultados en la literatura y también sugeridos por miembros del ICP según experiencias en el tratamiento palinológico.

*. Procedimiento llevado a cabo según la experiencia de Luis Fernando Peña, director del Laboratorio de Procesamiento de Muestras Geológicas del ICP en el tratamiento de muestras palinológicas.

3.3.1. Solución de Clorato de sodio 0,56 M y ácido nítrico 0,82 M†.

- A cuatro tubos de ensayo se adicionaron 0,5 mL de palinomorfos en cada uno y 0,15 g de NaClO₃. Se mezclaron estos componentes y se adicionaron 2 mL de HNO₃ al 65% a cada uno. Posteriormente, se dejaron los cuatro tubos de ensayo en baño maría por 10, 20, 30 y 40 minutos respectivamente con agitación constante.
- Al finalizar los tiempos respectivos se adicionaron 7,5 mL de agua destilada a cada uno de los tubos de ensayo y se centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido de cada uno de los tubos de ensayo en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones y se lavó con agua destilada.

3.3.2. Solución Ramsay [20].

- A cuatro tubos de ensayo se adicionaron 0,5 mL de palinomorfos en cada uno y 1,5 mL de la solución de Ramsay (2 g de Na₄P₂O₇, 25 mL de H₂O₂ al 35%, y 50 mL de agua destilada) y se dejaron en baño maría por 10, 20, 30 y 40 minutos respectivamente con agitación constante. Al finalizar los tiempos respectivos se adicionaron 8 mL de agua destilada a cada uno de los tubos de ensayo y se centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm.
- Finalmente se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido de cada uno de los tubos de ensayo en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones y se lavó con agua destilada.

3.3.3. Acetólisis [8].

- A cuatro tubos de ensayo se adicionaron 0,5 mL de palinomorfos en cada uno y 2,5 mL de ácido acético glacial, luego se centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm y se decantó el ácido. Posteriormente a cada tubo se adicionó 2,5 mL del líquido acetolítico (1 mL de ácido sulfúrico y 9 mL de anhídrido acético) y se dejaron en baño maría por 10, 20, 30 y 40 minutos respectivamente. Se decantó la solución y se filtró en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones con agua destilada. Luego los palinomorfos se

†. Solución sugerida por Luis Fernando Peña, director del Laboratorio de Procesamiento de Muestras Geológicas del ICP, según su experiencia en el tratamiento de palinomorfos termalmente alterados. Para hallar la concentración del NaClO₃ se supuso volúmenes aditivos de H₂O y HNO₃, y que el volumen de los palinomorfos no afectaba el volumen del agua.

transfirieron a los cuatro tubos de ensayo nuevamente y se les adicionó a cada uno 5 mL de ácido acético glacial, 1-3 gotas de clorato de sodio y 1-2 gotas de HCl al 37%.

- Posteriormente, se adicionaron 4,5 mL de agua destilada a cada uno de los tubos de ensayo y se centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm.
- Finalmente se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido de cada uno de los tubos de ensayo en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones y se lavó con agua destilada.

3.3.4. Hidróxido de potasio al 10% [8].

- A cuatro tubos de ensayo se adicionaron 0,5 mL de palinomorfos en cada uno y 1,5 mL de KOH y se dejaron en baño maría por 10, 20, 30 y 40 minutos respectivamente con agitación constante. Posteriormente, se adicionaron 8 ml de agua destilada a cada uno de los tubos de ensayo y se centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm.
- Finalmente se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido de cada uno de los tubos de ensayo en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones y se lavó con agua destilada.

3.3.5. Acido nítrico fumante[‡].

- A cuatro vasos de precipitados se adicionaron 0,5 mL de palinomorfos en cada uno y luego se sometieron a calentamiento hasta deshidratar los palinomorfos. Posteriormente, se adicionaron 0,34 g de KClO₃ y 4 mL de HNO₃ fumante. Se mezclaron estos componentes y se dejaron en reacción durante 10, 20, 30 y 40 minutos. Culminado cada período de reacción se agregó 240 mL de agua destilada para diluir la solución.
- Finalmente se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido de cada uno de los tubos de ensayo en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones y se lavó con agua destilada.

3.3.6. Hipoclorito de sodio al 7% [11].

- A ocho tubos de ensayo se adicionaron 0,5 mL de palinomorfos en cada uno y 1,5 mL de NaOCl y se dejaron en reacción durante 73 horas, preparándose los palinomorfos para su observación microscópica a las 4, 8,

[‡]. Procedimiento sugerido por Andrés Pardo, miembro del ICP, según su experiencia en el tratamiento con carbones.

12, 16, 20, 24, 48 y 73 horas. Posteriormente, se adicionaron 8 mL de agua destilada a cada uno de los tubos de ensayo y se centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm.

- Finalmente se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido de cada uno de los tubos de ensayo en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones y se lavó con agua destilada.

3.3.7. Peróxido de hidrógeno al 10% [8].

- A tres tubos de ensayo se adicionaron 0,5 mL de palinomorfos en cada uno y 0,5 mL de H₂O₂ y se dejaron durante 4, 21 y 73 horas respectivamente.
- Posteriormente, se adicionaron 9 mL de agua destilada a cada uno de los tubos de ensayo y se centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido de cada uno de los tubos de ensayo en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones y se lavó con agua destilada.

3.3.8. Permanganato de potasio al 10% [22, 23].

- Se agregó 1,5 mL de KMnO₄ a un tubo de ensayo que contenía 0,5 mL de palinomorfos y se dejó reaccionar durante 73 horas.
- Posteriormente, se adicionaron 8 mL de agua destilada y se centrifugó por 5 minutos a 2500 rpm. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se filtró el contenido del tubo de ensayo en un papel de filtro marca Nitex de 10 micrones y se lavó con agua destilada.

- *Montaje del material oxidado [24, 25]*

Para observar al microscopio los palinomorfos que fueron tratados con los diferentes agentes oxidantes, se prepararon de la misma manera como se describe en el numeral 2. Al terminar cada tratamiento se montaban sus respectivas láminas y eran guardadas en una caja portaláminas.

4. ANÁLISIS PALINOLÓGICO

El análisis palinológico se realizó en el Laboratorio de Micropaleontología del **Instituto Colombiano del Petróleo (ICP)**. Para ello se usó un microscopio Olympus Cx 21, con objetivos de 20X/0,50 para realizar el barrido general de la

placa y de 100X/1,25 para observar mejor los palinomorfos de interés, es decir, los de mayor abundancia en cada placa.

Luego de observar detenidamente cada una de las placas se escogieron tres géneros, dos de polen (*Classopolis* y *Callialasporites*) y uno de espora (*trilete*) que eran los más abundantes en cada una de ellas, Figura 8.



Figura 8. Géneros seleccionados: polen a) *Classopolis*, b) *Callialasporites* y espora c) *Trilete* de la formación Rosa Blanca del municipio de Zapatoca

5. DETERMINACIÓN DE LA COLORACIÓN DE LOS PALINOMORFOS

La determinación de la coloración de los palinomorfos se realizó utilizando el software Adobe Photoshop 7.0. Para esto se transfirieron las fotografías al computador y se midieron las intensidades del amarillo utilizando la escala de color CMYK (ver figura 7).

Para cuantificar el poder oxidativo de los diferentes tratamientos sobre los palinomorfos se realizó un análisis de varianza *ANOVA* tomando como variable dependiente a la intensidad del amarillo y como variables independientes el tiempo y el tipo de tratamiento. Para hacer esto se utilizó el paquete estadístico *STATGRAPHICS*.

Con ayuda del programa se determinó cuál o cuáles factores tenían un efecto estadísticamente significativo sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos. También se determinó si existían interacciones significativas entre las variables tiempo y tipo de tratamiento, con base en los valores *F* de la tabla *ANOVA* [26, 27].

III. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LOS PALINOMORFOS DE LA FORMACIÓN ROSA BLANCA DEL MUNICIPIO DE ZAPATOCA, SANTANDER.

Los palinomorfos extraídos de rocas de la formación Rosa Blanca del municipio de Zapatoca presentan una gran alteración termal, evidenciada por su color marrón oscuro, dificultando la observación al microscopio de las ornamentaciones de su capa externa llamada exina, empleadas en la identificación de la especie. Lo anterior se puede apreciar en la figura 9.



Figura 9. Palinomorfos termalmente alterados.

Estos palinomorfos presentaron un valor promedio para el porcentaje de la intensidad del amarillo del 59%.

2. EFECTO DEL TRATAMIENTO OXIDATIVO SOBRE LOS PALINOMORFOS

Los palinomorfos tratados con la solución de Schulze y con ácido nítrico al 65% presentaron poca decoloración, antes de 30 minutos de reacción, Tabla 3. Después de este tiempo, los palinomorfos tratados con la solución de Schulze se degradaron. La degradación se evidenció por la desaparición de las esporas y de los granos de polen y por la aparición de una coloración amarillenta en las placas palinológicas. Esto está de acuerdo con lo encontrado por Eshet y Hoek, quienes observaron la destrucción de los palinomorfos con la solución de Schulze luego de tres minutos de reacción durante el tratamiento con muestras con alto contenido de materia orgánica [11].

Los palinomorfos tratados con ácido nítrico al 65% no presentaron cambios significativos en su coloración, antes de 40 minutos, Tabla 3. Sin embargo, se

observó una disminución en la cantidad de palinomorfos por placa después de 30 minutos.

Tabla 3. Efecto de la solución de Schulze y del HNO₃ al 65% sobre la intensidad en la coloración amarilla de los palinomorfos extraídos de la formación Rosa Blanca del municipio de Zapatoca.

TIEMPO (min)	PROMEDIO DE LA INTENSIDAD DEL AMARILLO (%)	
	Solución de Schulze	HNO ₃ al 65%
10	64	59
20	69	62
30	62	59
40	-	61

(-) Desaparición de los palinomorfos

3. EFECTO DE OTROS OXIDANTES

Según los datos de la Tabla 4, el método de oxidación con la solución de NaClO₃ 0,56 M y HNO₃ 0,82 M fue el mejor con respecto a los otros métodos utilizados. Los palinomorfos presentaron el más alto porcentaje de intensidad del amarillo, aproximándose al color adecuado para la observación y clasificación taxonómica, Figura 10.

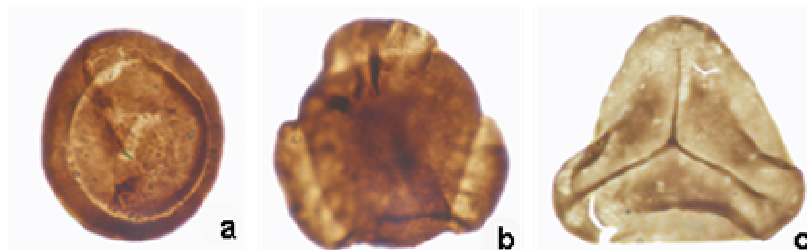


Figura 10. Palinomorfos oxidados con la solución de NaClO₃ 0,56 M y HNO₃ 0,82 M. a) Classopolis, b) Callialasporites y c) Trilete

Los valores promedios de los porcentajes de la intensidad del amarillo para 10, 20 y 30 minutos de reacción con la solución de NaClO₃ 0,56 M y HNO₃ 0,82 M fueron respectivamente 68, 63 y 69%. Debido a que los porcentajes para 10 y 30 minutos fueron muy cercanos, no se puede concluir alguna tendencia de la intensidad del amarillo con el incremento del tiempo de tratamiento.

En cuanto a los demás oxidantes (solución Ramsay, KOH al 10%, acetólisis, HNO₃ fumante, NaOCl al 7%, H₂O₂ al 10% y KMnO₄ al 10%) se pueden observar valores para la coloración de los palinomorfos similares para todas, que están entre el 59 y

64%. Esto indica que el grado de decoloración obtenido no es el adecuado para la clasificación de estas especies, ver Anexo 1.

Los porcentajes de la intensidad del amarillo de los palinomorfos variaron para una misma muestra, esto puede ser debido a que la alteración termal de todos los palinomorfos presentes en la roca no es homogénea.

Con el HNO₃ fumante y el método de acetólisis, se observó poca decoloración de los palinomorfos antes de 30 minutos de reacción, luego de este tiempo se observó también la destrucción de la muestra, con placas completamente manchadas de un color amarillento sin distinción de palinomorfos.

La presencia de los palinomorfos en las placas disminuyó luego de 40 minutos de reacción con la solución Ramsay y el KOH al 10%.

Con el NaOCl al 7% y el H₂O₂ al 10% no se observaron palinomorfos luego de 20 y 21 horas de reacción respectivamente.

Se dejó reaccionar el KMnO₄ al 10% durante 73 horas porque según Brown en su libro Técnicas Palinológicas este fue el tiempo necesario para decolorar los palinomorfos. En cambio, en los palinomorfos observados esto no ocurrió y no era viable dejar la muestra por más tiempo, ya que el objetivo de esta investigación era encontrar además de un método adecuado para la decoloración de los palinomorfos y que no fuese tan dispendioso en términos de tiempo.

Los palinomorfos tratados con la solución de NaClO₃ 0,56 M y HNO₃ 0,82 M presentaron el mejor grado de decoloración, especialmente luego de 30 minutos de reacción. Sin embargo, después de 40 minutos la cantidad de palinomorfos presentes en la muestra disminuyó.

Tabla 4. Efecto de las soluciones de NaClO₃ 0,56 M y HNO₃ 0,82 M, solución Ramsay, KOH al 10%, el método de acetólisis y el ácido nítrico fumante sobre la intensidad en la coloración amarilla de los palinomorfos extraídos de la formación Rosa Blanca del municipio de Zapatoca.

TIEMPO (min)	PROMEDIO DE LA INTENSIDAD DEL AMARILLO (%)				
	Solución de NaClO ₃ 0,56 M y HNO ₃ 0,82 M	Solución Ramsay	KOH al 10%	Acetólisis	HNO ₃ fumante
10	68	62	61	58	58
20	63	60	58	62	61
30	69	60	58	62	62
40	70	67	57	-	-

(-) Desaparición de los palinomorfos

Tabla 5. Efecto del NaOCl al 7%, el H₂O₂ al 10% y el KMnO₄ al 10% sobre la intensidad en la coloración amarilla de los palinomorfos extraídos de la formación Rosa Blanca del municipio de Zapatoca.

TIEMPO (horas)	PROMEDIO DE LA INTENSIDAD DEL AMARILLO (%)		
	NaOCl al 7%	H ₂ O ₂ al 10%	KMnO ₄ al 10%
4	58	61	N.D
8	63	N.D	N.D
12	60	N.D	N.D
16	62	N.D	N.D
20	64	N.D	N.D
21	-	63	N.D
73	-	-	57

(-) Desaparición de palinomorfos

N.D. No determinado

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Luego de obtener los porcentajes de la intensidad del amarillo de cada uno de los tratamientos ensayados, estos se analizaron estadísticamente por medio de un análisis de varianza de dos factores. Observándose de esta manera el efecto de los factores tiempo de reacción y tipo de tratamiento oxidativo sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos.

El análisis estadístico se realizó por separado para los tratamientos con tiempos de reacción entre 10 y 40 minutos y para los tratamientos con tiempos de reacción entre 4 y 21 horas.

A continuación describiré los resultados del análisis estadístico para cada uno.

4.1. TRATAMIENTOS CON TIEMPOS DE REACCIÓN ENTRE 10 Y 40 MINUTOS.

Se analizaron los siguientes tratamientos: solución de Schulze, KOH al 10%, Acetólisis, solución de NaClO₃ 0,56 M y HNO₃ 0,82 M, HNO₃ al 65%, solución Ramsay y HNO₃ fumante, cuyos números que los identifican en las tablas y gráficas se muestran en la Tabla 6.

Las contribuciones debidas al tiempo y al tipo de tratamiento sobre la variabilidad de la intensidad del amarillo se muestran en la Tabla 7. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Los niveles de significación del estadístico F fueron 0,9 y 0 para el tiempo y el tratamiento respectivamente.

Como el valor-P para el tiempo es mayor que 0,05, este no es significativamente influyente en el incremento de la intensidad del amarillo, mientras que las diferencias entre los tratamientos sí aparecen como significativas a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 6. Identificación de los tratamientos oxidativos para el análisis estadístico

TRATAMIENTO	IDENTIFICACIÓN
Solución de Schulze	-3
KOH al 10%	-2
Acetólisis	-1
Solución de NaClO ₃ 0,56 M y HNO ₃ 0,82 M	0
HNO ₃ al 65%	1
Solución Ramsay	2
HNO ₃ fumante	3

Tabla 7. Efecto del tiempo y del tipo de tratamiento sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrada	F	Valor-P
Efectos					
A: Tiempo (min)	47,0	4	11,6	0,3	0,9
B: Tratamiento	2073,8	6	345,6	8,3	0
Residual	11174,0	269	41,5		
Total (corregido)	13342,5	279			

El análisis de los datos determinó que no hubo interacción entre las variables independientes tiempo y tipo de tratamiento.

En la Tabla 8 se presentan los resultados de la prueba de rangos múltiples para la intensidad del amarillo.

Con base en estos resultados se puede concluir que no hay diferencias significativas entre las intensidades del amarillo de cada tiempo al nivel de confianza del 95%, según el procedimiento de mínimas diferencias significativas (LSD) de Fisher.

En la Tabla 9 se muestra la media de la intensidad del amarillo para cada nivel de las variables, así como el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad del muestreo y los intervalos de confianza para cada una de las medias muestran los coeficientes que precisamente pueden estimarse como significativos con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 8. Efecto del tiempo de tratamiento sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos

Método: 95% LSD			
Tiempo	Tamaño de la muestra	Media	Grupos Homogéneos
10	72	61,9	X
20	84	61,9	X
30	72	61,3	X
40	40	62,4	X
Contraste		Diferencia	Límites +/-
10-20		0,02	2,03
10-30		0,63	2,12
10-40		-0,54	2,50
20-30		0,61	2,04
20-40		-0,56	2,44
30-40		-1,17	2,50

Para la variable tiempo se observa un leve incremento de las medias de las intensidades del amarillo a medida que este aumenta, en cuanto a los tratamientos, la media de la intensidad del amarillo más alta corresponde al realizado con la solución de NaClO_3 0,56 M y HNO_3 0,82 M, cuyo número de identificación es el cero (0). Una vez más se confirman los resultados obtenidos mediante el análisis palinológico y el realizado con el software Adobe Photoshop, de que el tratamiento oxidativo con mejores resultados fue el realizado con la solución de NaClO_3 0,56 M y HNO_3 0,82 M.

En la Figura 11 se puede observar que el tiempo de reacción no tuvo ningún efecto significativo sobre la intensidad del amarillo, en cambio en la Figura 12 si se puede apreciar una respuesta significativa de la intensidad del amarillo debida al tratamiento con la solución de NaClO_3 0,56 M y HNO_3 0,82 M cuyo número de identificación es el cero (0), respecto a los demás tratamientos.

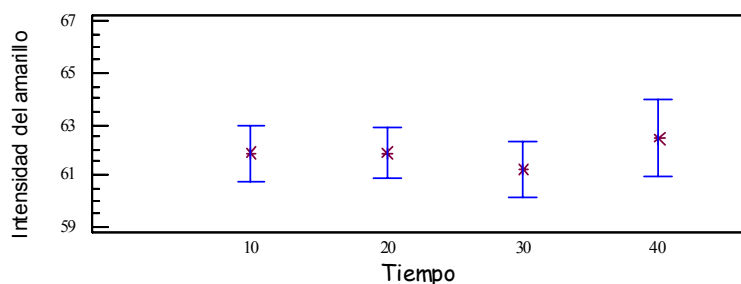


Figura 11. Efecto del tiempo de reacción sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos con un intervalo de confianza del 95%

Tabla 9. Media de los cuadrados con un intervalo de confianza del 95%

Nivel	Tamaño de la muestra	Media	Error estándar	Límite superior	Límite inferior
Media total	280	62,1			
Tiempo (mtos)					
10	72	61,9	0,8	60,3	63,4
20	84	61,9	0,7	60,5	63,2
30	72	61,3	0,8	59,7	62,8
40	40	62,4	1,1	60,3	64,6
Tratamiento					
-3	44	64,0	1,1	61,9	66,1
-2	42	59,0	1,1	56,9	61,2
-1	36	60,9	1,2	58,5	63,2
0	44	67,6	1,1	65,5	69,6
1	48	60,1	1,0	58,2	62,0
2	42	61,7	1,1	59,6	63,9
3	24	61,2	1,5	58,3	64,1

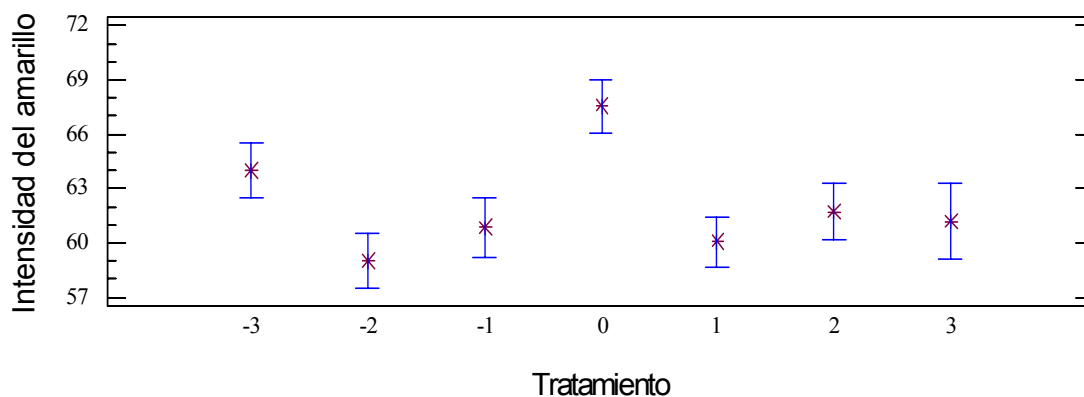


Figura 12. Efecto del método de oxidación sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos

4.2. TRATAMIENTOS CON TIEMPOS DE REACCIÓN ENTRE 4 Y 21 HORAS.

Se analizaron los siguientes tratamientos: H₂O₂ al 10% y NaOCl al 7%, cuyos números que los identifican en las tablas y gráficas son respectivamente -1 y 0. Se eliminó del análisis el tratamiento con KMnO₄ al 10% porque el programa STATGRAPHICS no lo reconoció, ya que solo se ensayó a un solo tiempo (73 horas).

La Tabla 10 muestra que los niveles de significación del estadístico F fueron 0,22 y 0,26 para el tiempo y el tratamiento respectivamente. Puesto que no hay valores-P menores que 0,05, ninguna de las variables tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la intensidad del amarillo a un nivel de confianza del 95%. Además, no existió interacción entre el tiempo y el tipo de tratamiento.

Tabla 10. Efecto del tiempo y del tipo de tratamiento sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrada	F	Valor-P
Efectos					
A: Tiempo horas)	286,2	5	57,2	1,4	0,22
B: Tratamiento	51,6	1	51,6	1,3	0,26
Residual	3080,4	77	40,0		
Total (corregido)	3374,6	83			

En la Tabla 11 se presentan los resultados de la prueba de rangos múltiples para la intensidad del amarillo.

Según el procedimiento de mínimas diferencias significativas (LSD) de Fisher se determinó diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95% entre los pares de medias 4-8 horas y 4-20 horas de reacción.

En la Tabla 12 se puede observar que para el incremento de la variable tiempo no existe linealidad que indique aumento o reducción de la intensidad del amarillo; en cuanto a los tratamientos, la media de la intensidad del amarillo más alta corresponde al realizado con H₂O₂ al 10% en comparación con el NaOCl al 7%.

En la Figura 13 se puede observar que el tiempo de reacción no tuvo ningún efecto significativo sobre la intensidad del amarillo. En la Figura 14 se aprecia una respuesta significativa de la intensidad del amarillo debida al tratamiento con H₂O₂ al 10%, respecto al tratamiento con NaOCl al 7%.

Tabla 11. Efecto del tiempo de tratamiento sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos

Método: 95% LSD			
Tiempo	Tamaño de la muestra	Media	Grupos Homogéneos
4	24	59,5	X
12	12	61,6	XX
21	12	61,6	XX
16	12	63,0	XX
8	12	64,8	X
20	12	65,1	X
Contraste		Diferencia	Límites +/-
4-8		*-5,3	4,4
4-12		-2,0	4,4
4-16		-3,5	4,4
4-20		*-5,6	4,4
4-21		-2,0	4,4
8-12		3,2	5,1
8-16		1,8	5,1
8-20		-0,3	5,1
8-21		3,2	5,1
12-16		-1,5	5,1
12-20		-3,6	5,1
12-21		-0,0	5,1
16-20		-2,1	5,1
16-21		1,4	5,1
20-21		3,5	5,1

* Denota una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 12. Media de los cuadrados con un intervalo de confianza del 95%

Nivel	Tamaño de la muestra	Media	Error estándar	Límite superior	Límite inferior
Media total	84	62,6			
Tiempo (horas)					
4	24	59,5	1,3	57,0	62,1
8	12	64,8	2,2	60,4	69,3
12	12	61,6	2,2	57,1	66,0
16	12	63,0	2,2	58,6	67,5
20	12	65,1	2,2	60,7	69,6
21	12	61,6	2,2	57,1	66,0
Tratamiento					
-1	24	64,1	2,1	60,0	68,2
0	60	61,1	1,0	59,2	63,1

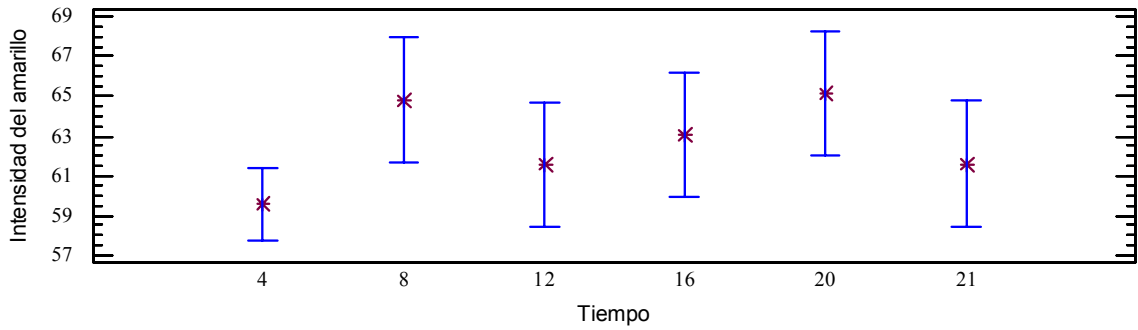


Figura 13. Efecto del tiempo de reacción sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos con un intervalo de confianza del 95%

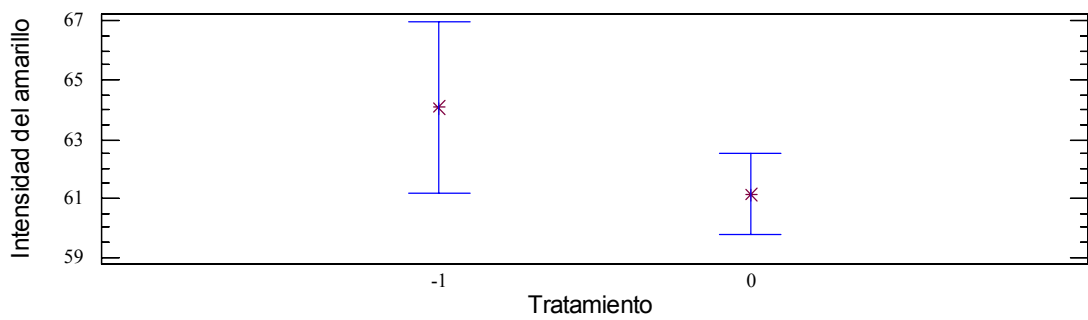


Figura 14. Efecto del método de oxidación sobre la intensidad del amarillo de los palinomorfos

IV. CONCLUSIONES

Basados en los resultados obtenidos en la presente investigación podemos concluir:

1. Los palinomorfos extraídos de rocas de la formación Rosa Blanca ubicada en el municipio de Zapatoca presentan alteración termal que dificulta su clasificación taxonómica.
2. El tratamiento con solución de NaClO_3 0,56 M y HNO_3 0,82 M de los palinomorfos extraídos de la formación Rosa Blanca, ubicada en el municipio de Zapatoca, produce un 69% en la escala de la intensidad del amarillo que facilita la observación microscópica de las ornamentaciones y clasificación.
3. La decoloración de los palinomorfos es independiente del tiempo de permanencia en contacto con las soluciones oxidantes y dependiente del tratamiento oxidativo.
4. El tratamiento con las soluciones Schulze, HNO_3 al 65%, KOH al 10%, Ramsay, NaOCl al 7%, H_2O_2 al 10%, KMnO_4 al 10%, el método de acetólisis y el HNO_3 fumante no produce una decoloración de los palinomorfos extraídos de la formación Rosa Blanca ubicada en el municipio de Zapatoca.

V. RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio químico de la composición de los palinomorfos termalmente alterados extraídos de pozos petroleros colombianos.
2. Hacer un análisis estructural de las principales moléculas constituyentes de la exina de los palinomorfos termalmente alterados, extraídos de pozos petroleros colombianos.

ANEXO 1. LISTA DE PLANCHAS CORRESPONDIENTES A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS OXIDATIVOS

Planchas 1 y 2. Materia Orgánica (Sin oxidación).

Fig. 1-15. *Classopollis* sp.

Fig. 16-18. *Callialasporites* sp.

Fig. 19-28. *Psilatriteles* sp.

Fig. 29. Vista general.

Planchas 3 y 4. Tratamiento con la solución de NaClO₃ 0,56M y HNO₃ 0,82M

10 minutos.

Fig. 1-5. *Classopollis* sp.

Fig. 6-8. *Psilatriteles* sp.

Fig. 9-12. *Callialasporites* sp.

20 minutos.

Fig. 13-15. *Classopollis* sp.

Fig. 16-20. *Psilatriteles* sp.

Fig. 21-24. *Callialasporites* sp.

30 minutos.

Fig. 25-29. *Classopollis* sp.

Fig. 30-32. *Psilatriteles* sp.

Fig. 33-36. *Callialasporites* sp.

40 minutos.

Fig. 37-41. *Psilatriteles* sp.

Fig. 42-44. *Cicatricosisporites*.

Planchas 5 y 6. Tratamiento con la solución de Schulze.

10 minutos.

Fig. 1-3. *Classopollis* sp.

Fig. 4-6. *Psilatriteles* sp.

Fig. 7-9. *Cicatricosisporites*.

Fig. 10-12. *Callialasporites* sp.

20 minutos.

Fig. 13-16. *Classopollis* sp.

Fig. 17-21. *Psilatriteles* sp.

Fig. 22,23. *Cicatricosisporites*.

Fig. 24. *Callialasporites* sp.

30 minutos.

Fig. 25-27. *Classopollis* sp.

Fig. 28-34. *Psilatriteles* sp.

Fig. 35,36. *Callialasporites* sp.

40 minutos.

Fig. 37. *Classopollis* sp.

Fig. 38-41. *Psilatriteles* sp.

Fig. 42. *Cicatricosisporites*.

Fig. 43,44. *Callialasporites* sp.

Planchas 7 y 8. Tratamiento con el HNO₃ al 65%.

10 minutos.

Fig. 1-4. *Classopollis* sp.

Fig. 5-10. *Psilatriteles* sp.

Fig. 11,12. *Callialasporites* sp.

20 minutos.

Fig. 13-16. *Classopollis* sp.

Fig. 17-22. *Psilatriteles* sp.

Fig. 23,24. *Callialasporites* sp.

30 minutos.

Fig. 25-29. *Classopollis* sp.

Fig. 30,31. *Psilatriteles* sp.

Fig. 32-36. *Callialasporites* sp.

40 minutos.

Fig. 37-40. *Classopollis* sp.

Fig. 41-48. *Psilatriteles* sp.

Planchas 9-11. Tratamiento con el NaOCl al 7%.

4 horas.

Fig. 1-3. *Classopollis* sp.

Fig. 4-8. *Psilatriteles* sp.

Fig. 9-12. *Callialasporites sp.*

8 horas.

Fig. 13-20. *Classopollis sp.*

Fig. 21-23. *Psilatriteles sp.*

Fig. 24,25. *Callialasporites sp.*

12 horas.

Fig. 26-31. *Classopollis sp.*

Fig. 32-35. *Psilatriteles sp.*

Fig. 36,37. *Callialasporites sp.*

16 horas.

Fig. 38-44. *Classopollis sp.*

Fig. 45-47. *Psilatriteles sp.*

Fig. 48. *Cicatricosporites.*

Fig. 49. *Callialasporites sp.*

20 horas.

Fig. 50-52. *Classopollis sp.*

Fig. 53-55. *Psilatriteles sp.*

Fig. 56-60. *Callialasporites sp.*

Plancha 12. Tratamiento con el H₂O₂ al 10%.

4 horas.

Fig. 1-3. *Classopollis sp.*

Fig. 4-10. *Psilatriteles sp.*

Fig. 11. *Cicatricosporites.*

Fig. 12. *Callialasporites sp.*

21 horas.

Fig. 13-17. *Classopollis sp.*

Fig. 18-23. *Psilatriteles sp.*

Fig. 24. *Callialasporites sp.*

Planchas 13 y 14. Tratamiento con la solución Ramsay.

10 minutos.

Fig. 1-4. *Classopollis sp.*

Fig. 5-11. *Psilatriteles sp.*

Fig. 12. *Callialasporites sp.*

20 minutos.

Fig. 13-17. *Classopollis* sp.

Fig. 18-23. *Psilatriteles* sp.

Fig. 24. *Callialasporites* sp.

30 minutos.

Fig. 25-28. *Classopollis* sp.

Fig. 29-34. *Psilatriteles* sp.

Fig. 35,36. *Callialasporites* sp.

40 minutos.

Fig. 37-39. *Classopollis* sp.

Fig. 40,41. *Psilatriteles* sp.

Fig. 42. *Callialasporites* sp.

Planchas 15 y 16. Tratamiento con el método de Acetólisis.

10 minutos.

Fig. 1,2. *Classopollis* sp.

Fig. 3-7. *Psilatriteles* sp.

Fig. 8-12. *Callialasporites* sp.

20 minutos.

Fig. 13-16. *Classopollis* sp.

Fig. 17-19. *Psilatriteles* sp.

Fig. 20-24. *Callialasporites* sp.

30 minutos.

Fig. 25-28. *Classopollis* sp.

Fig. 29-32. *Psilatriteles* sp.

Fig. 33-36. *Callialasporites* sp.

Planchas 17 y 18. Tratamiento con KOH al 10%

10 minutos.

Fig. 1-6. *Classopollis* sp.

Fig. 7-10. *Psilatriteles* sp.

Fig. 11,12. *Callialasporites* sp.

20 minutos.

Fig. 13-16. *Classopollis* sp.

Fig. 17-21. *Psilatriteles* sp.

Fig. 22-24. *Callialasporites* sp.

30 minutos.

Fig. 25,26. *Classopollis* sp.

Fig. 27-32. *Psilatriteles* sp.

Fig. 33-36. *Callialasporites* sp.

40 minutos.

Fig. 37,38. *Classopollis* sp.

Fig. 39-41. *Psilatriteles* sp.

Fig. 42. *Callialasporites* sp.

Plancha 18. Tratamiento con KMnO_4 al 10%

73 horas

Fig. 1,2. *Classopolis* sp.

Fig. 3-5. *Psilatriteles* sp.

Fig. 6. *Callialasporites* sp.

Plancha 19 y 20. Tratamiento con HNO_3 fumante (100%)

10 minutos.

Fig. 1-4. *Classopollis* sp.

Fig. 5-9. *Psilatriteles* sp.

Fig. 10. *Cicatricosisporites*.

Fig. 11,12. *Callialasporites* sp.

20 minutos.

Fig. 13-18. *Classopollis* sp.

Fig. 19-22. *Psilatriteles* sp.

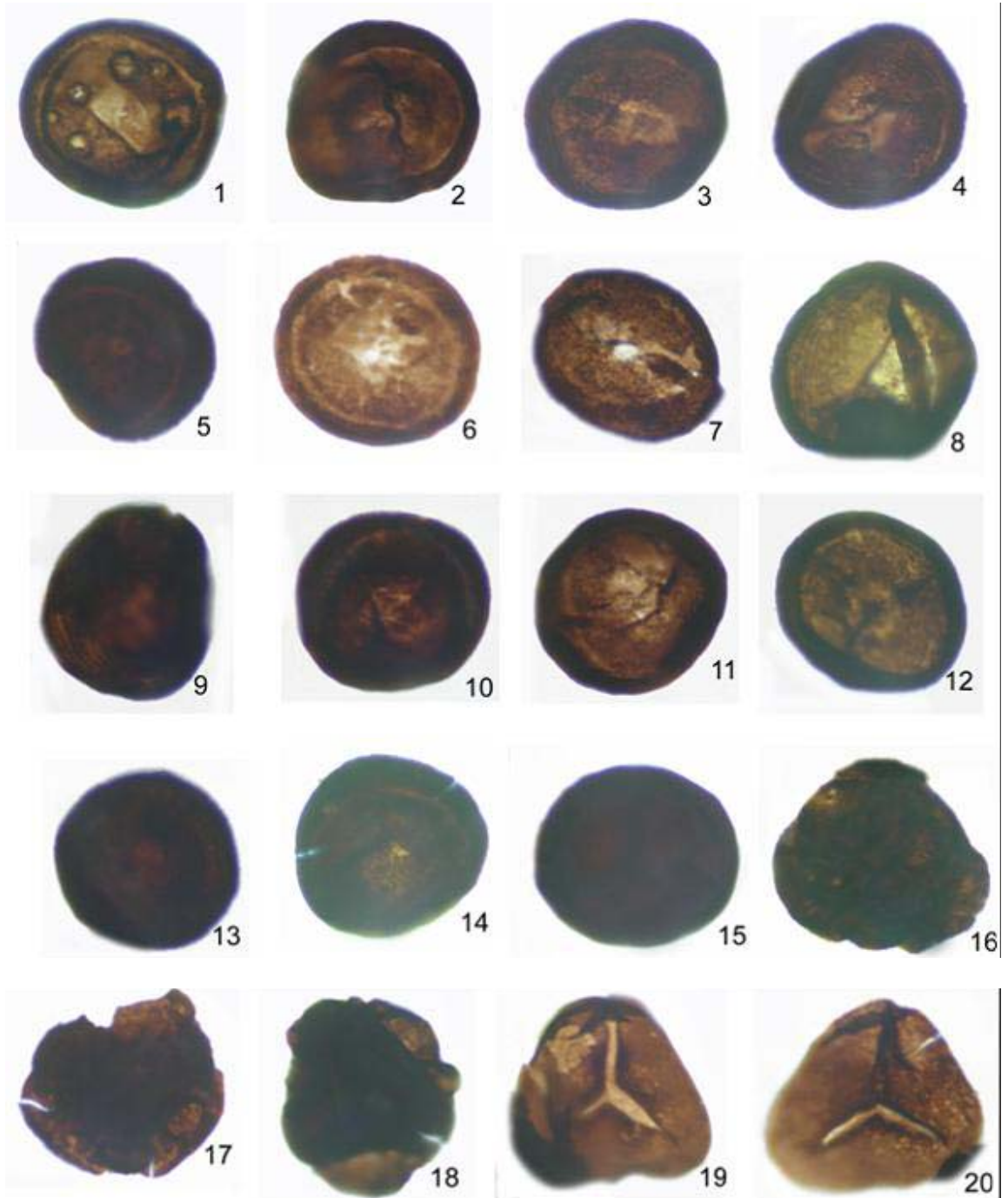
Fig. 23,24. *Callialasporites* sp.

30 minutos

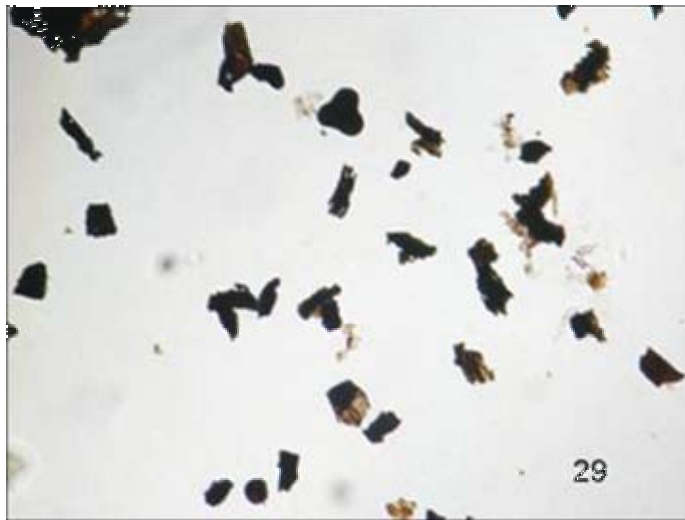
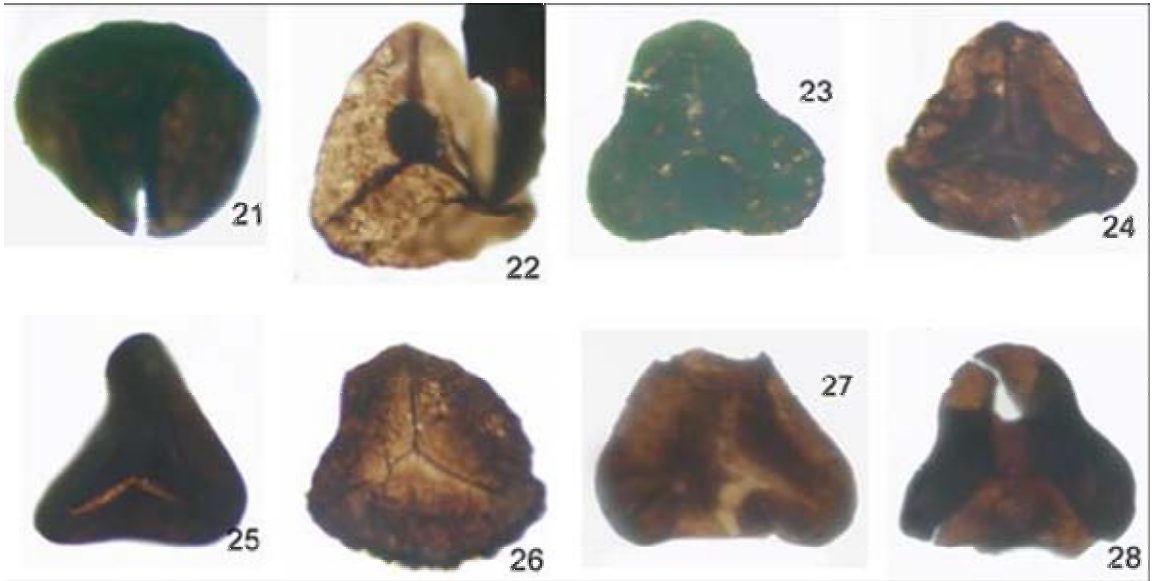
Fig. 25-27. *Classopollis* sp.

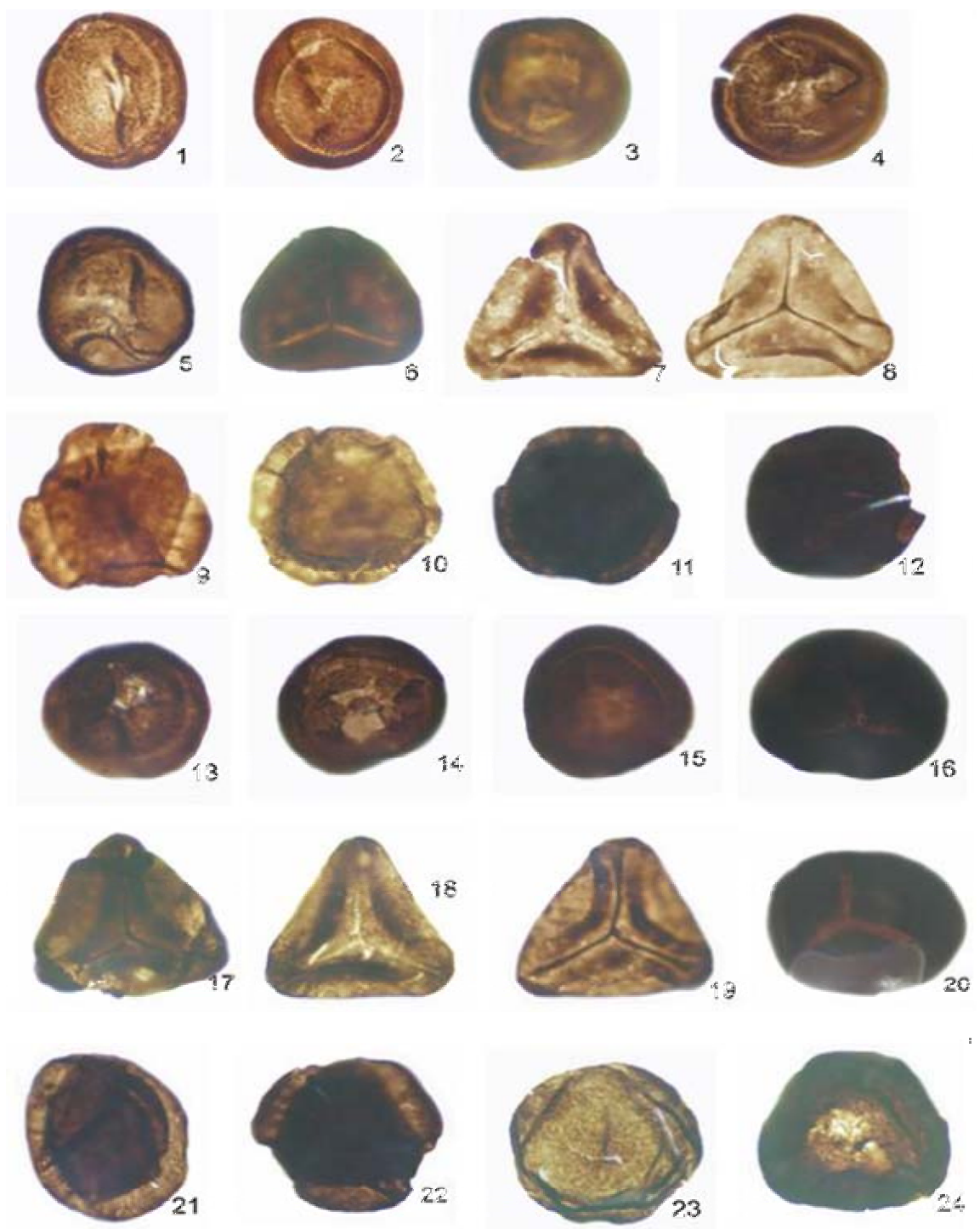
Fig. 28-30. *Psilatriteles* sp.

Fig. 31-36. *Callialasporites* sp.

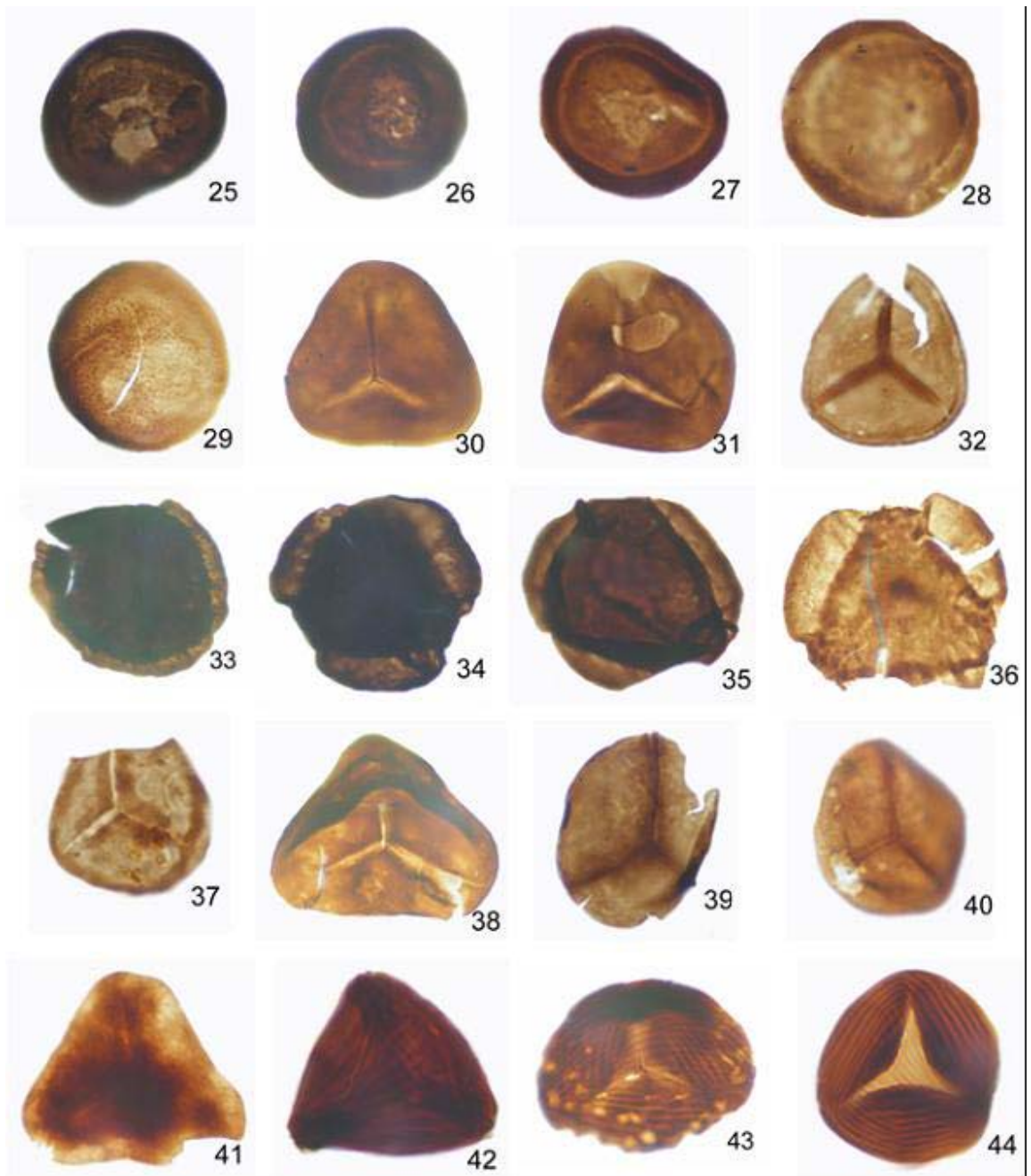


Material orgánico, Plancha 1

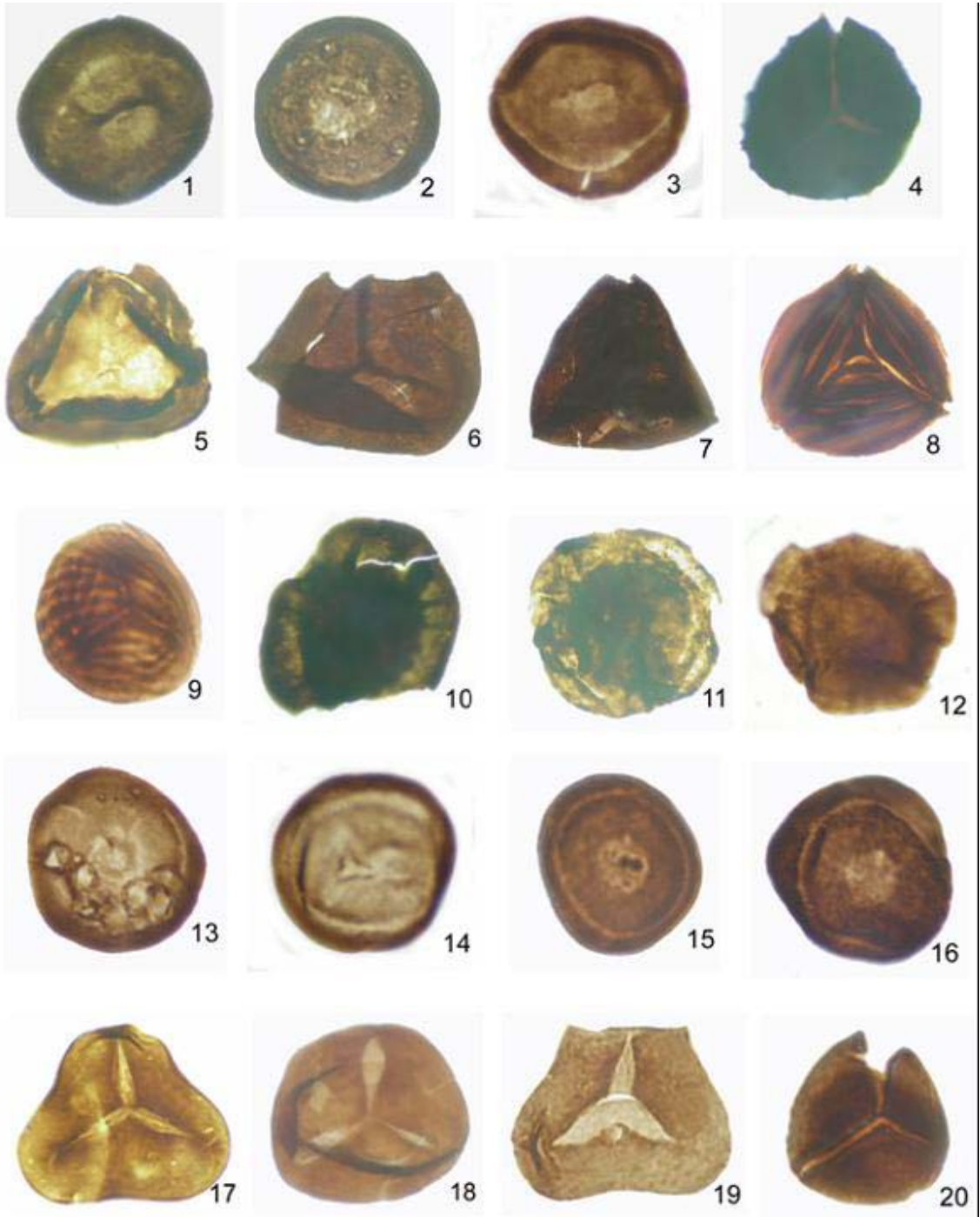




Solución de NaClO_3 0,56 M y HNO_3 0,82 M, Plancha 3



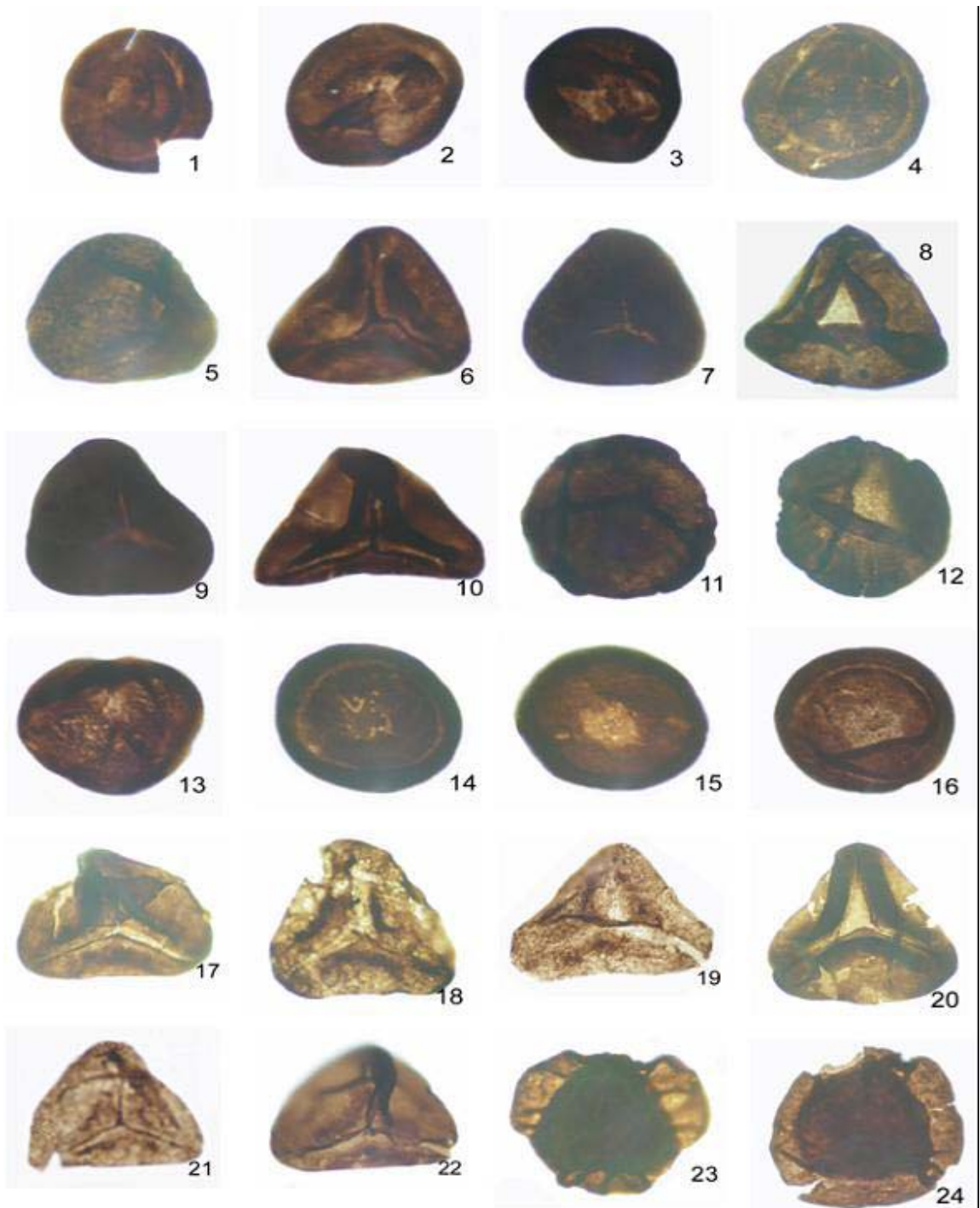
Solución de NaClO_3 0,56 M y HNO_3 0,82 M, Plancha 4



Solución de Schulze, Plancha 5



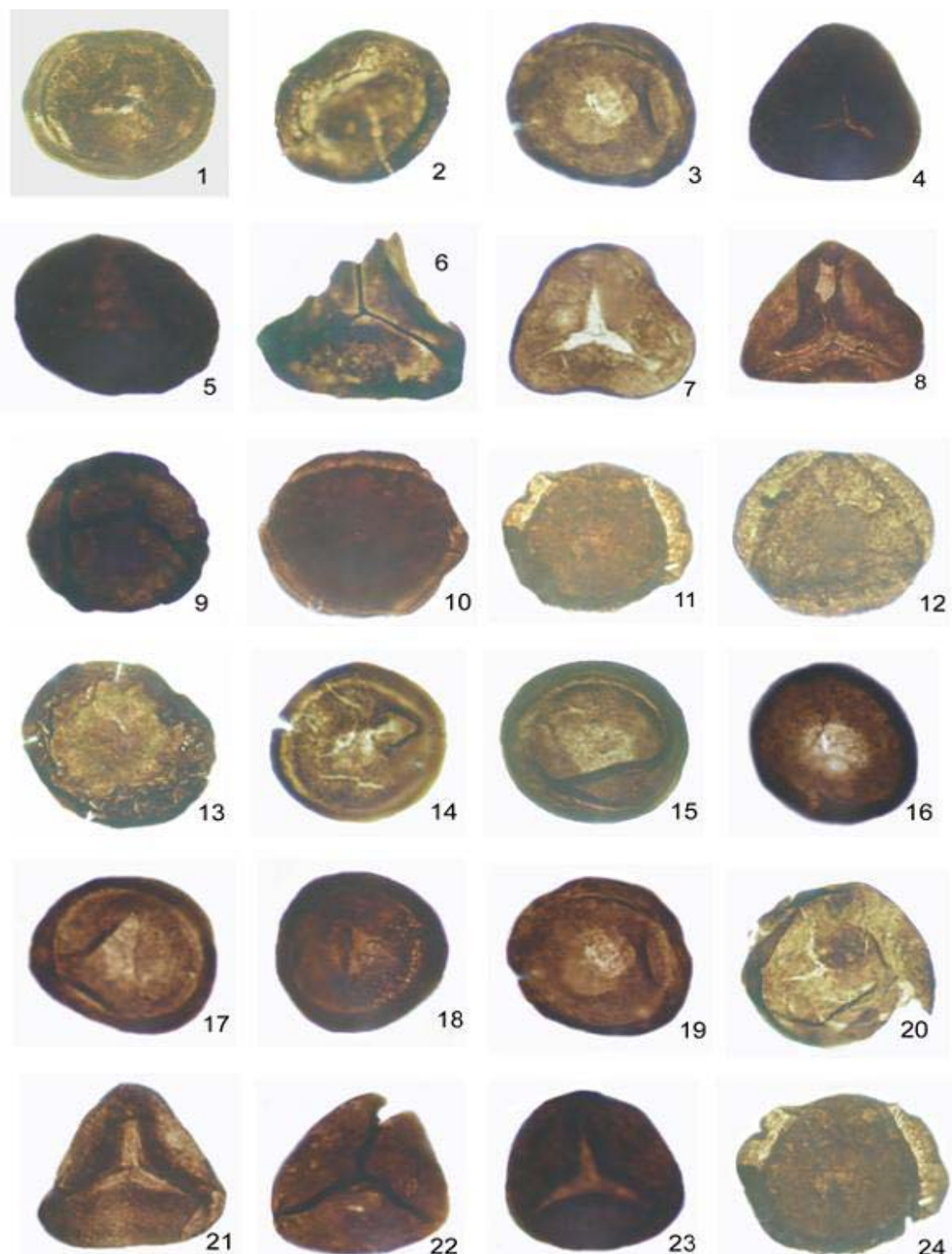
Solución de Schulze, Plancha 6



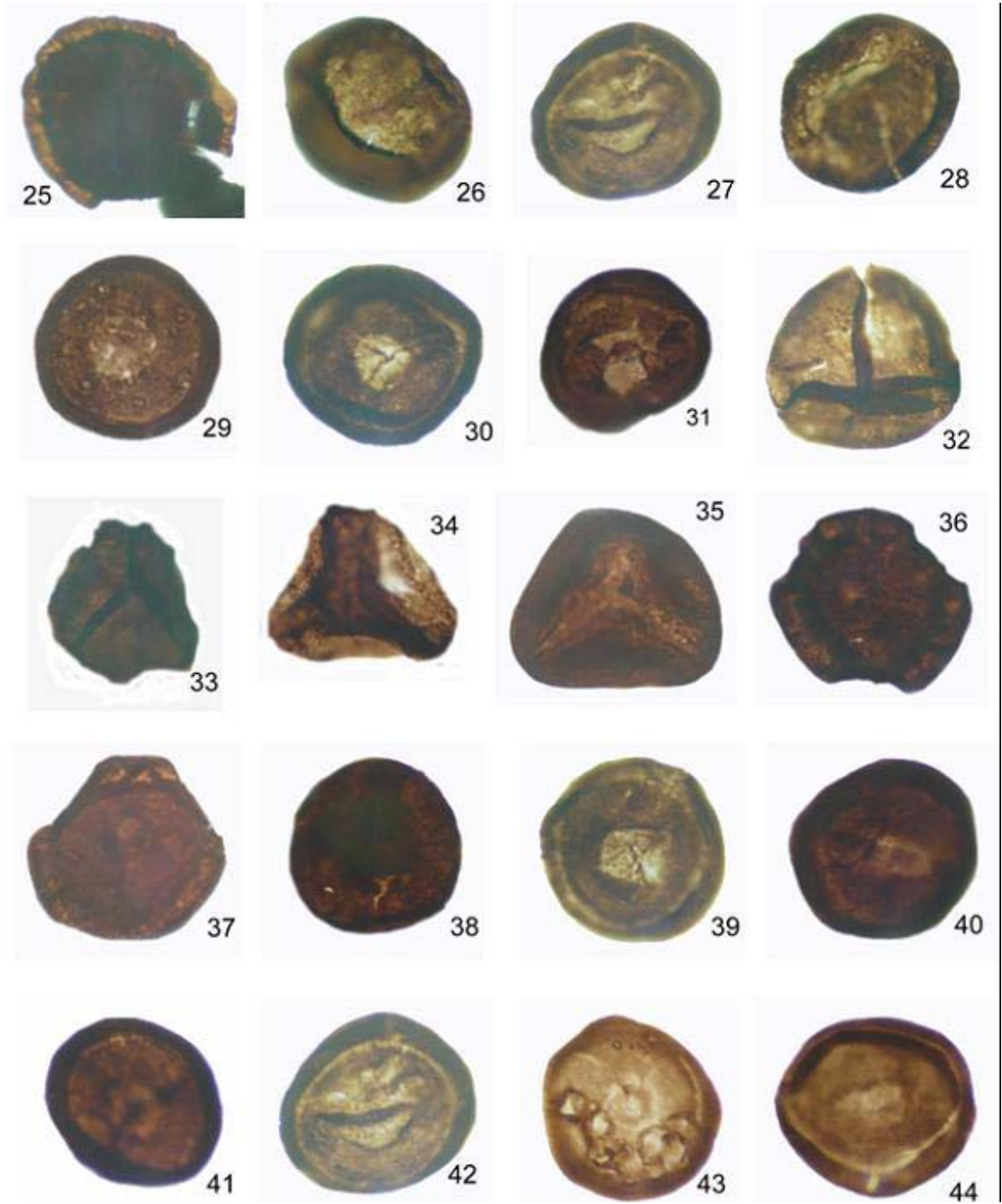
HNO₃ al 65%, Plancha 7



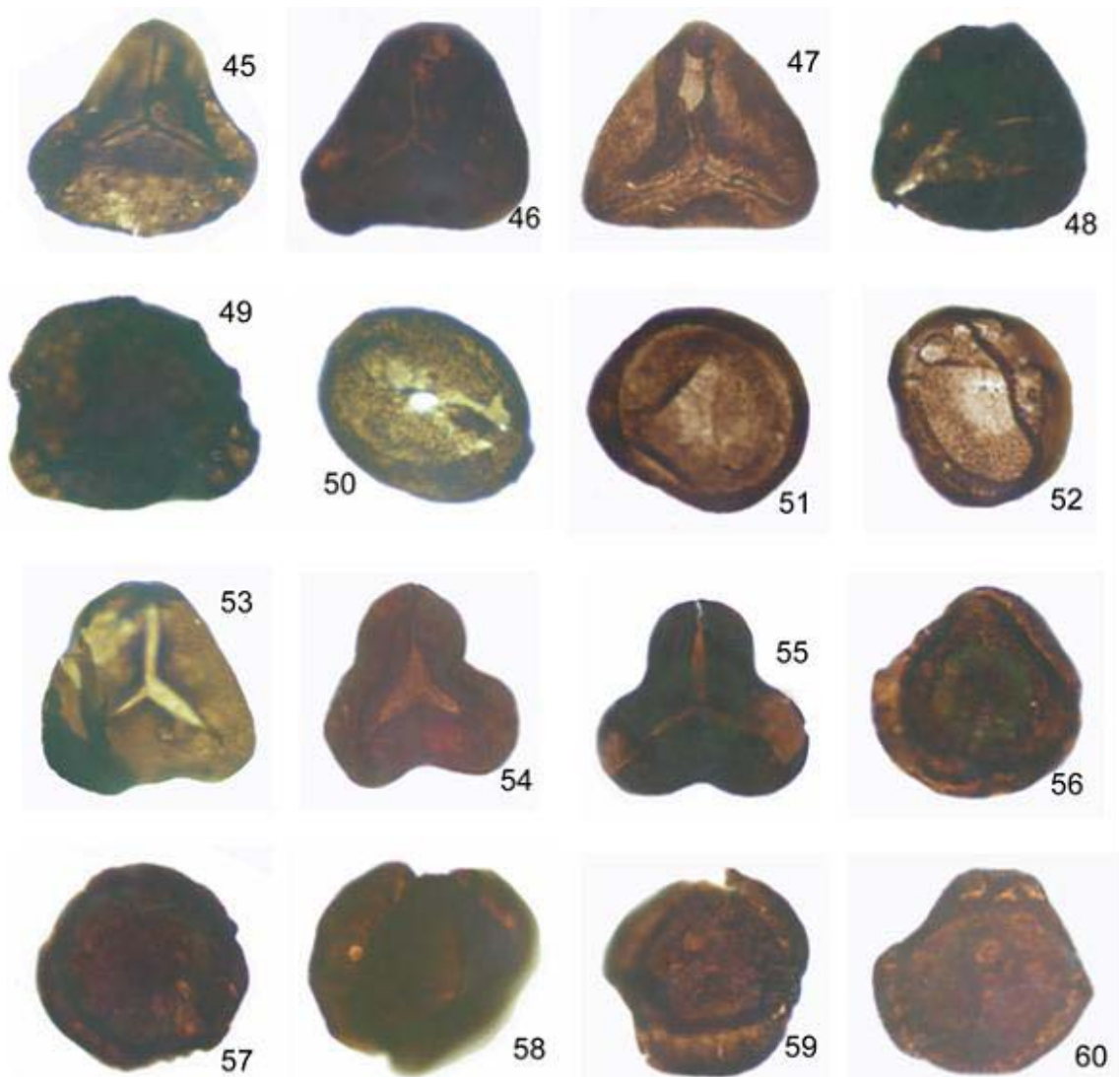
HNO₃ al 65%, Plancha 8



NaOCl al 7%, Plancha 9



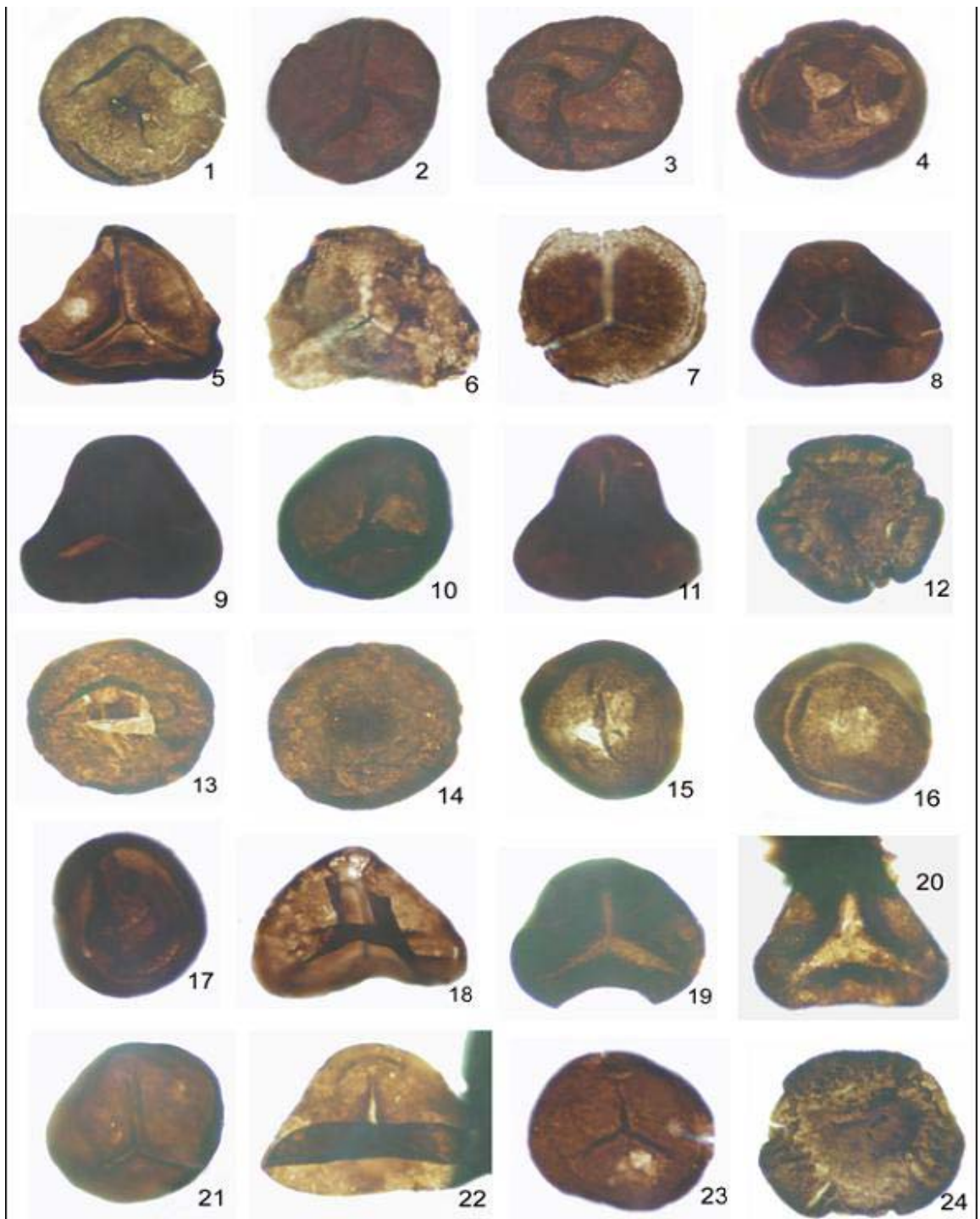
NaOCl al 7%, Plancha 10



NaOCl al 7%, Plancha 11



H₂O₂ al 10%, Plancha 12



Solución Ramsys, Plancha 13



25



26



27



28



29



30



31



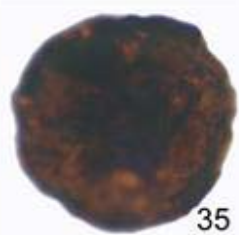
32



33



34



35



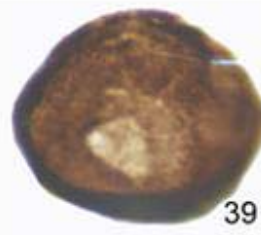
36



37



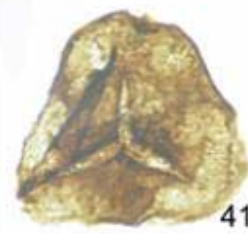
38



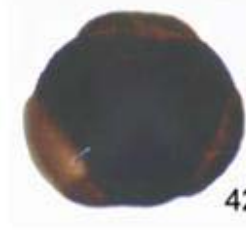
39



40

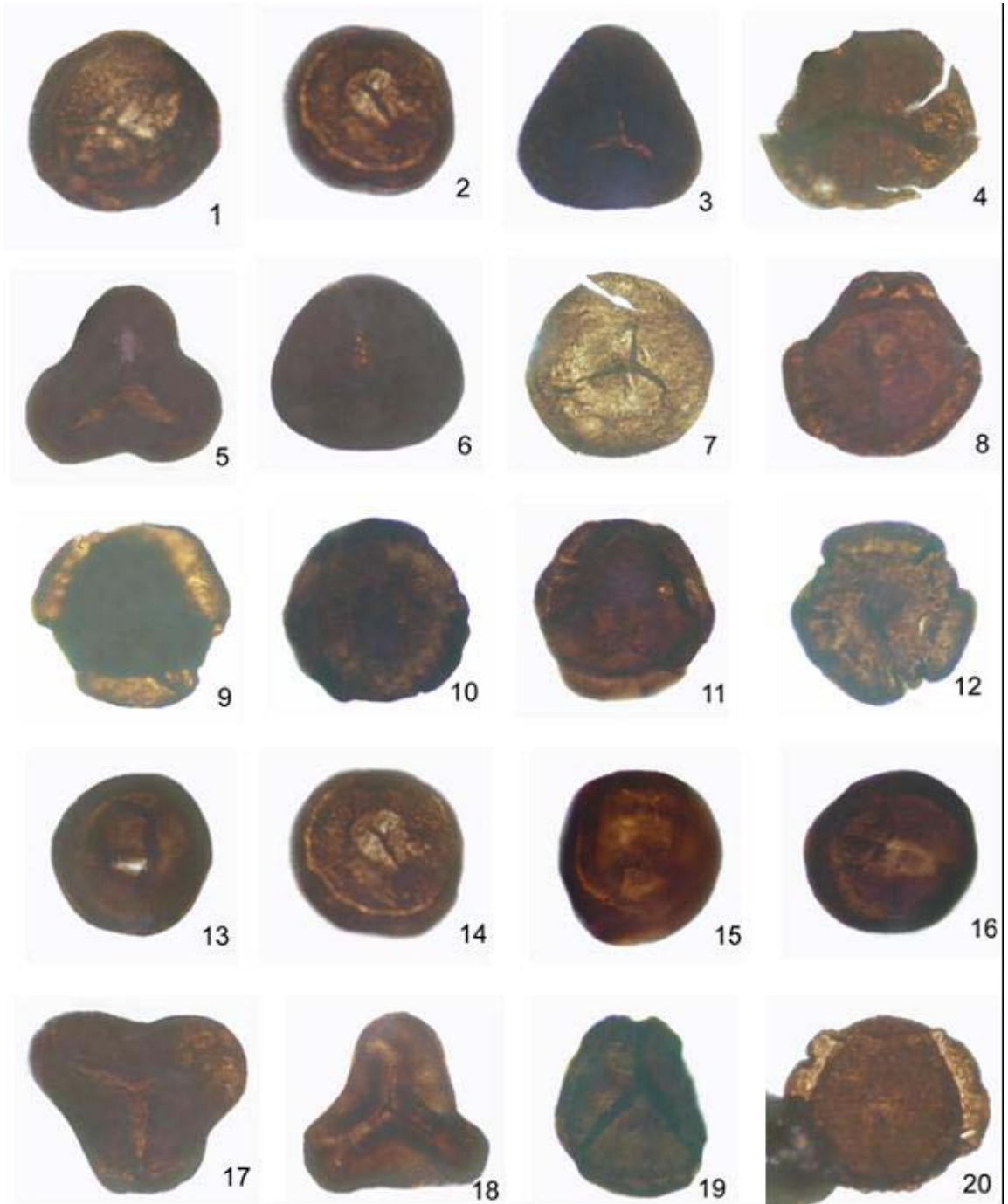


41

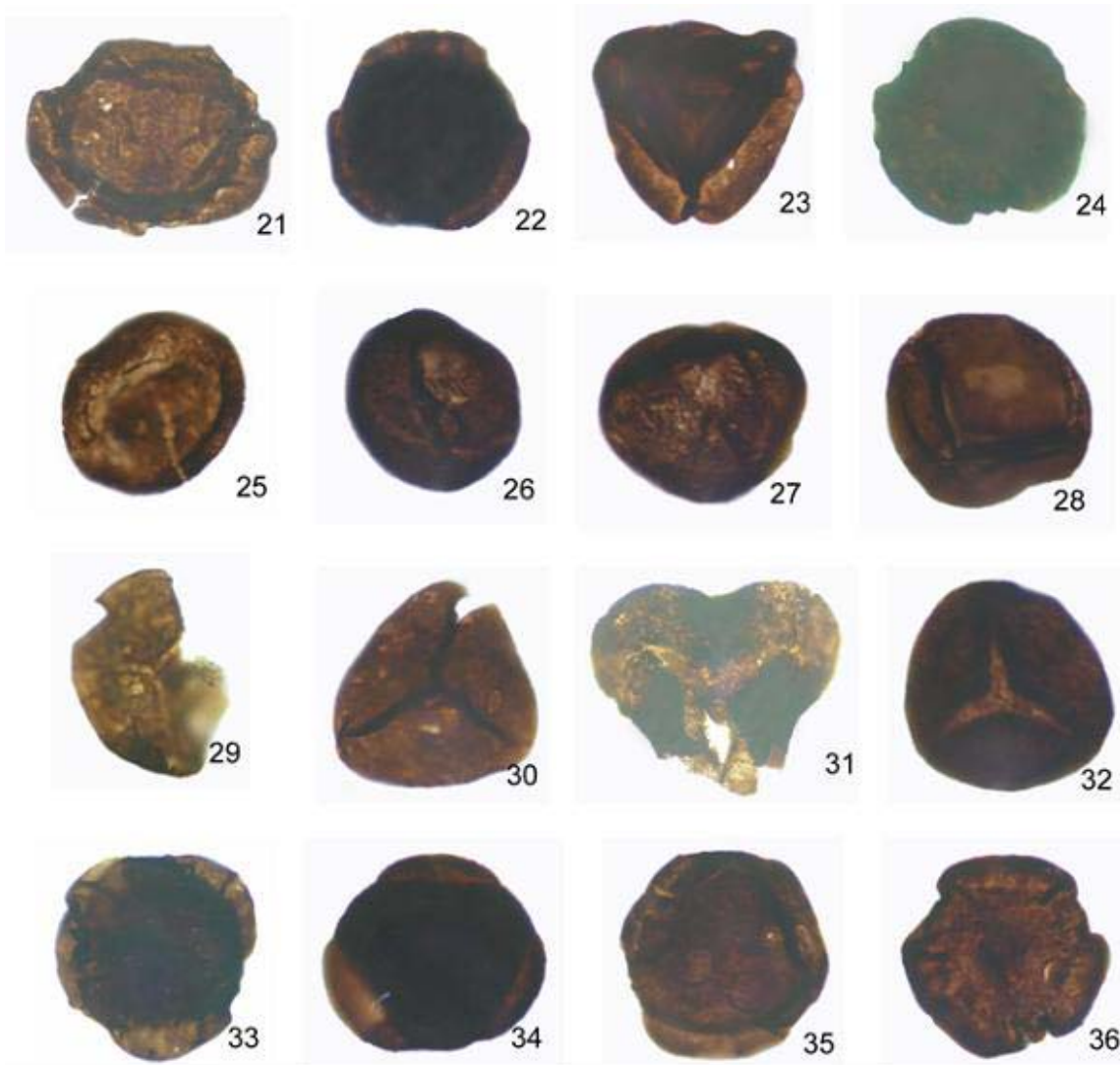


42

Solución Ramsys, Plancha 14



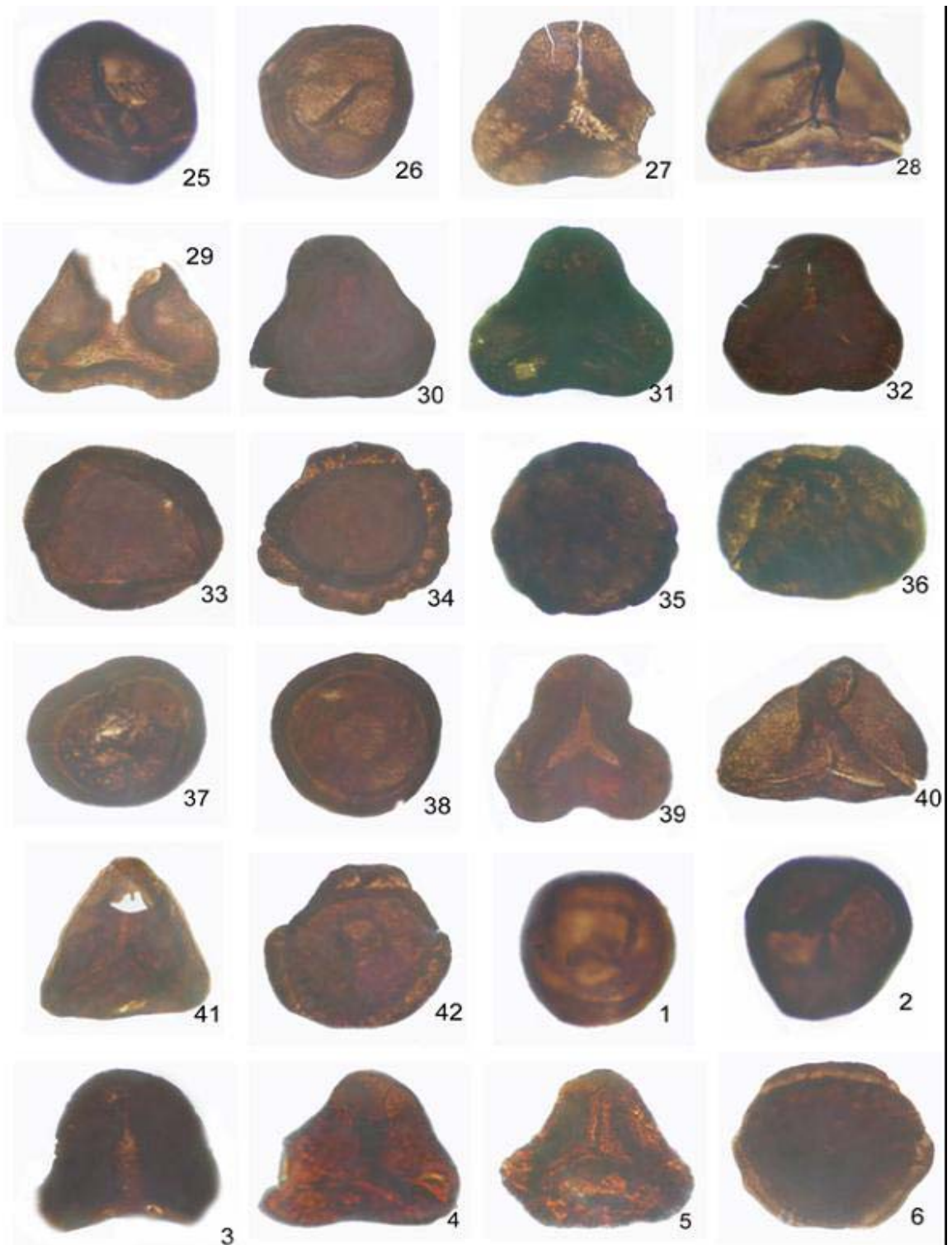
Acetólisis, Plancha 15



Acetólisis, Plancha 16



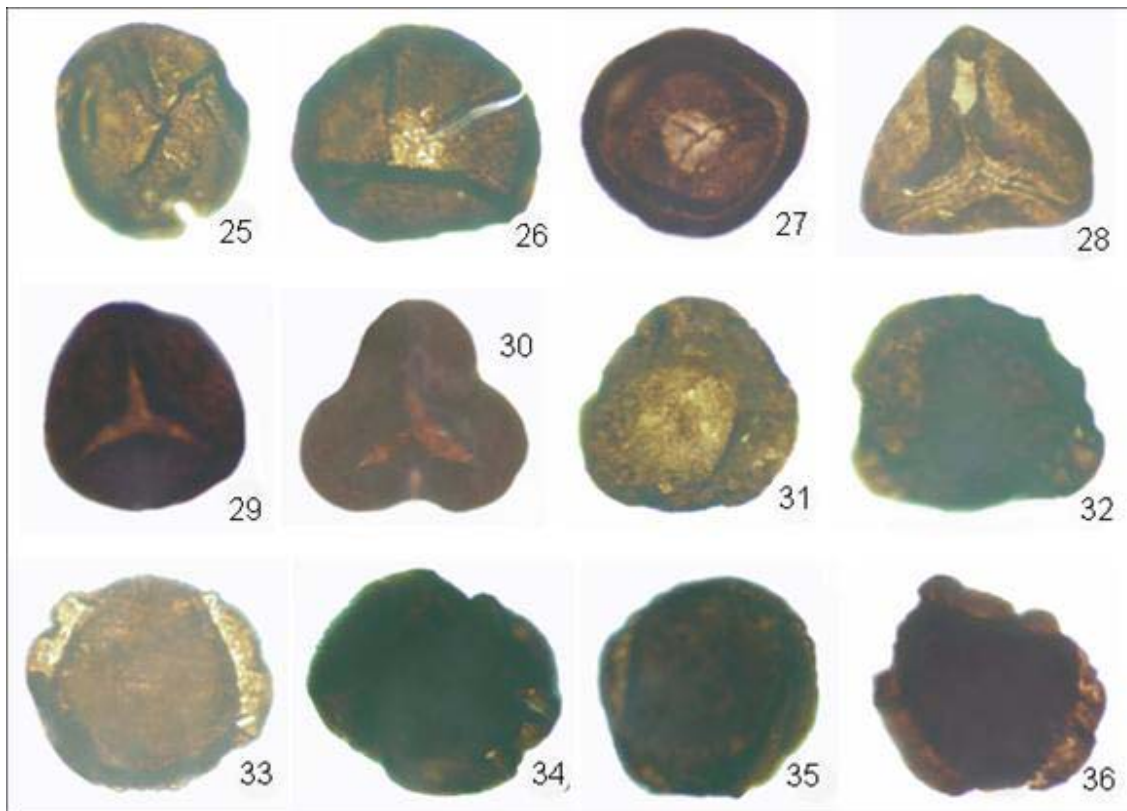
KOH al 10%, Plancha 17



KOH al 10% y KMnO_4 al 10%, Plancha 18



HNO₃ al 100% (Fumante), Plancha 19



HNO₃ al 100% (Fumante), Plancha 20

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
1. TRAVERSE A.. Paleopalynology. Boston. USA : UNWIN HYMAN, 1988. p.p. 1, 28, 29, 35-46.
 2. COX, M.M. Carbohydrates and Glycobiology. 3 ed. New York. USA : WORTH PUBLISHERS, 2000. p.p. 58.
 3. WODEHOUSE, R.. Pollen Grains. New York and London. USA : HAFNEER PUBLISHING COMPANY, 1965. p.p. 1-6.
 4. YULE B.I., ROBERTS S. and MARSHALL J.E.A.. The Thermal Evolution of Sporopollenin. *Organic Geochemistry*, **2000**; 31: 859-870.
 5. BROOKS J. and SHAW G.. Sporopollenin: a Review of its Chemistry, Palaeochemistry and Geochemistry. Grana, 1978; 17: 91-97.
 6. HEMSLEY A.R. et. al.. Studies of Fossil and Modern Spore Wall Biomacromolecules Using ¹³C Solid State NMR. *Annals of Botany*, **1996**; 78: 83-94.
 7. STEENBERGEN, A.. Palynological Techniques for Rock Sample Processing. Boston. USA : UNWIN HYMAN, 1997. p.p. 4.
 8. BROWN, C.. Palynological Techniques. Los Angeles. USA : BATON ROUGE, 1960. p.p. 1-16.
 9. JANSONIUS J. and MCGREGOR D.C.. Palynology: Principles and Applications. USA : AMERICAN ASSOCIATION OF STRATIGRAPHIC PALINOLOGISTS FOUNDATION, 1969. p.p. 34, 37, 250-251, 285, 463.

10. UESUGUI, N.B.. Palinología: Técnicas de Tratamiento de Muestras. B. Téc. Petrobras, 1979; 22: 229-240.

11. ESHET, Y. and HOEK, R.. Palynological Processing of Organic-Rich Rocks, or: How Many Times Have you Called a Palyniferous Sample "Barren"? Review of Palaeobotany and Palynology, 1996; 94: 101-109.

12. MOORE P.D., WEBB J.A. and COLLISON M.E.. Pollen Analysis. 2 ed. Oxford. USA : BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, 1991. p.p. 1, 2, 10, 55-61.

13. <http://mailweb.udlap.mx/~progra/Ayuda/Guias/Photoshop/html>

14. HOLGUIN, F. y HAYASHI, L.. Estadística Elementos de Muestreo y Correlación. México : EDITORIAL DIANA, 1993. p.p. 459-467.

15. NAIMAN, A., ROSENFELD, R. y ZIRKEL, G.. Introducción a la Estadística. México : McGRAW-HILL, 1987. p.p. 285-301, 361-364.

16. NETER, J., WASSEMAN, W. y WHITMORE, G.A.. Fundamentos de Estadística para Negocios y Economía. México : COMPAÑÍA EDITORIAL CONTINENTAL S.A. p.p. 489-499.

17. GARCIA, R.. Tutorial STATGRAPHICS Plus Versión 5.0. Centro de Procesos de Datos. Universidad Complutense de Madrid.

18. BERENSON, M.L. y LEVINE, D.M.. Estadística Básica en Administración, Conceptos y Aplicaciones. 4 ed. MÉXICO : PRENTICE-HALL HISPANOAMERICANA, S.A., 1992. p.p. 160, 164, 172.

19. SAENZ, C.. Polen y Esporas. Madrid. España : H. BLUME EDICIONES, 1978. p.p. 51-52, 105-111.

20. BATES, C.D., COXON, P. and GIBBARD, P.L.. A New Method for the Preparation of Clay-Rich Sediment Samples for Palynological Investigation. *New Phytol*, 1978; 81: 459-463.

21. PADILLA, L. and GONCLAVES, J.H.. Practical Method of Palynologic Preparation of Pre-Mesozoic Sediments. *B. Geoci. Petrobras*, 1987; 2: 205-214.

22. YULE B.I., ROBERTS S. and MARSHALL J.E.A.. The Thermal Evolution of Sporopollenin. *Organic Geochemistry*, 2000; 31: 859-870.

23. CWYNAR, L.C., BURDEN, E. and McANDREWS, J.H.. An Inexpensive Sieving Method for Concentrating Pollen and Spores from Fine-Grained Sediments. *Can. J. Earth Sci.*, **1979**; 16: 1115-1120.

24. HAYATSU, R. et. al.. Chemical Alteration of a Biological Polymer "Sporopollenin" During Coalification: Origin, Formation, and Transformation of the Coal Maceral Sporinite. *Energy & Fuels*, 1988; 2: 843-847.

25. GABARAYEVA, N., BLACKMORE, S. and ROWLEY, J.R.. Observations on the Experimental Destruction and Substructural Organisation of the Pollen Wall of Some Selected Gymnosperms and Angiosperms. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 2003; 124: 203-226.

26. OSTLE, B.. *Statistics in Research*. 2 ed. U.S.A. : THE IOWA STATE UNIVERSITY PRESS, 1963. p.p. 310

27. SNEDECOR, G. and COCHRAN, W.G.. *Statistical Methods*. 6 ed. U.S.A. : THE IOWA STATE UNIVERSITY PRESS, 1967. p.p. 265, 300.