



**WCCE11 - 11th WORLD CONGRESS OF
CHEMICAL ENGINEERING**

IACCHE - XXX INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING
CAIQ2023 - XI ARGENTINIAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING
CIBIQ2023 - II IBEROAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING

Buenos Aires - Argentina - June 4-8, 2023

"The global chemical engineering working for a better future world"

**Abstracts presented at
XI CAIQ - XXX IACCHE**



WCCE11 - 11th WORLD CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING

IACCHE - XXX INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING

CAIQ2023 - XI ARGENTINIAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING

CIBIQ2023 - II IBEROAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING

Buenos Aires - Argentina - June 4-8, 2023

"The global chemical engineering working for a better future world"

Biomarcadores: herramienta potencial para identificar el origen de vertidos de crudo sobre entornos continentales

Tomas, G.J.^{1,2}, Acuña, A.J.²

1 Centro de Investigación y Transferencia de Santa Cruz – CONICET. Av. Lisandro de la Torre 860, Río Gallegos (9400) Santa Cruz.

2 Grupo de Estudios Ambientales (GEA), Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional Santa Cruz. Los Inmigrantes 555, Río Gallegos (CP9400), Santa Cruz.

germanjaviertomas@frsc.utn.edu.ar

Cuando tiene lugar un derrame accidental o intencional de hidrocarburos en diferentes tipos de suelos, la mayoría de los crudos permanecerán cerca del punto de vertido, y la meteorización natural es el proceso principal que eliminará gradualmente sus componentes [1]. Como resultado de las transformaciones que experimenta el crudo se dificulta la asignación de responsabilidades respecto a las contaminaciones producidas con este recurso. Sin embargo, en el mismo existen unas moléculas conocidas como biomarcadores con el potencial de resistir los procesos de meteorización por los que atraviesan los hidrocarburos cuando son liberados en el ambiente. En el presente trabajo se analizó la estabilidad de los biomarcadores para un crudo vertido en suelo bajo condiciones de laboratorio por el período de un año, con el objetivo de demostrar que estas moléculas constituyen una herramienta capaz de identificar el origen de los derrames petrolíferos en los entornos continentales con la finalidad de establecer a los responsables que deberán remediar los ecosistemas afectados. Para tal fin, la muestra de crudo fue recolectada en el Yacimiento Del Mosquito (Cuenca Austral) y transportada al laboratorio en una botella limpia de vidrio (color ámbar) para evitar la fotooxidación. El ensayo de meteorización se llevó a cabo en 30 reactores a escala de laboratorio repartidos equitativamente a lo largo de diez etapas. En cada uno de ellos se añadió 10 g de suelo y un 1 mL de crudo. Los reactores se dejaron abiertos, es decir, sin tapa a la temperatura ambiente promedio del laboratorio de 20 °C para que la intemperización tuviera lugar. Cumplido los tiempos de permanencia, los crudos fueron extraídos de los sistemas mediante una extracción acelerada con disolventes y sometidos posteriormente a una separación por cromatografía de adsorción sólido-líquido en columna para obtener las fracciones alifáticas que fueron analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas [2]. A partir de las abundancias relativas de los biomarcadores integrados se calcularon las relaciones de diagnóstico, es decir, cocientes entre dos o más moléculas de interés. Cabe destacar que entre todas las relaciones sólo los cocientes $P/n-C_{17}$, $F/n-C_{18}$ y $(n-C_{13} + n-C_{14})/(n-C_{25} + n-C_{26})$ tuvieron una desviación estándar relativa por encima del 5 %, cuyo valor es el máximo permitido para establecer que una relación es estable. Estos resultados, más el análisis preliminar de los cromatogramas obtenidos, sugieren que los biomarcadores analizados constituyen una herramienta potencial para vincular los derrames de hidrocarburos con sus responsables, ya que la mayoría de estas moléculas permanecieron inalteradas bajo las condiciones de ensayo a lo largo del tiempo de estudio.

Referencias

1. Zhang, H., Yin, X., Zhou, H., Wang, J., Han, L. (2015). Weathering Characteristics of Crude Oils from Dalian Oil Spill Accident, China. *Aquatic Procedia*, 3, 238-244.
2. Stashenko, E., Martínez, J., Robles, M. (2014). Extracción Selectiva y Detección Específica de Biomarcadores Saturados del Petróleo. *Scientia Chromatographica*, 6, 251-268.

Section: "Sustainability and the Environment: Environmental and soil remediation. Solid, liquid and gaseous effluents. Nano Materials applications".



WCCE11 - 11th WORLD CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING

IACCHE - XXX INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING
CAIQ2023 - XI ARGENTINIAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING
CIBIQ2023 - II IBEROAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING

Buenos Aires - Argentina - June 4-8, 2023

"The global chemical engineering working for a better future world"

Biomarcadores: herramienta potencial para identificar el origen de vertidos de crudo sobre entornos continentales

Tomas, G.J.^{1,2}, Acuña, A.J.²

1 Centro de Investigación y Transferencia de Santa Cruz – CONICET. Av. Lisandro de la Torre 860, Río Gallegos (9400) Santa Cruz.

2 Grupo de Estudios Ambientales (GEA), Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional Santa Cruz. Los Inmigrantes 555, Río Gallegos (CP9400), Santa Cruz.

germanjaviertomas@frsc.utn.edu.ar

RESUMEN

Cuando tiene lugar un vertido de crudo en entornos continentales comienza un proceso de meteorización que modifica la composición original de este recurso y en etapas avanzadas puede quedar irreconocible respecto al hidrocarburo original dificultando la asignación de responsabilidades asociadas a las contaminaciones de este tipo. En el presente trabajo se analizó la estabilidad de los biomarcadores alifáticos en un crudo liviano sometido a un proceso de meteorización en suelo bajo condiciones de laboratorio por el período de un año, para ser aplicado en litigios vinculados a derrames y/o hurtos de hidrocarburos. El ensayo de meteorización se llevó a cabo en 30 reactores a escala de laboratorio repartidos equitativamente a lo largo de diez etapas. Cumplido los tiempos de permanencia, los crudos fueron extraídos de los sistemas y analizados por GC/MS. A partir de las abundancias relativas de los biomarcadores integrados se calcularon las relaciones de diagnóstico, es decir, cocientes entre dos o más moléculas de interés. Cabe destacar que entre todas las relaciones, sólo los cocientes $P/n-C_{17}$, $F/n-C_{18}$ y $(n-C_{13} + n-C_{14}) / (n-C_{25} + n-C_{26})$ tuvieron una desviación estándar relativa por encima del 5 %, cuyo valor es el máximo permitido para establecer que una relación es estable. Estos resultados, más el análisis preliminar de los cromatogramas obtenidos, sugieren que los biomarcadores analizados constituyen una herramienta potencial para vincular los derrames de hidrocarburos con sus responsables, ya que la mayoría de estas moléculas permanecieron inalteradas bajo las condiciones de ensayo a lo largo del tiempo de estudio.

Palabras clave: *n-alcanos, esteranos, terpanos, pristano y fitano.*

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por hidrocarburos de los entornos continentales suele asociarse a fallos de los equipos, reventones en los pozos, filtraciones en los camiones cisterna, ruptura de los oleoductos, daños intencionados en las instalaciones operativas y por el abastecimiento ilegal de crudo (Service et al., 2012). En este sentido tanto los suelos como los humedales son entornos de baja energía y el petróleo una vez derramado permanecerá cerca del punto de vertido (Prince et al., 2003). La fracción liviana se volatilizará y/o biodegradará, y una porción significativa se infiltrará verticalmente en el subsuelo, permaneciendo en su matriz durante años (Yavari et al., 2015). Determinar el origen de los derrames, es fundamental para evaluar sus consecuencias y definir las estrategias para dar respuesta a esta problemática. Para lograrlo es muy importante caracterizar estos vertidos a partir de métodos analíticos eficientes que permitan aplicar leyes de control con el objetivo de proteger la salud pública y el medio ambiente (Kienhuis et al., 2019). Es así que los análisis químicos de huellas dactilares han demostrado ser métodos sólidos y fiables para investigar e identificar el origen de los vertidos, diferenciar y correlacionar muestras de crudos, estudiar procesos de meteorización y, además, determinar los cambios producidos en los hidrocarburos considerando una amplia variedad de condiciones (Kao et al., 2015). Este procedimiento se ha utilizado ampliamente (Wang y Fingas, 2003) y fue estandarizado por el Comité Europeo de Normalización (CEN) en el año 2009 (Kienhuis et al., 2019). El mismo consiste en determinar una serie de moléculas presentes en los crudos mediante cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama (GC/FID) o acoplado a un espectrómetro de masas (GC/MS).

1.2 Biomarcadores

Los hidrocarburos están constituidos por miles de compuestos que forman un entramado molecular que no se conoce con exactitud, entre todos ellos destacan los biomarcadores, compuestos formados por unidades repetidas de isopreno (Peters et al., 2005). Estas moléculas tienen el potencial de resistir los procesos de meteorización según el tiempo de exposición, la cinética de alteración y los fenómenos de transformación por los que atraviesa el crudo cuando es expuesto al ambiente (Wang et al., 2006). El objetivo del presente trabajo fue analizar la estabilidad de los biomarcadores a partir de un crudo liviano sometido a un proceso de meteorización en reactores abiertos con suelo a escala de laboratorio con una temperatura promedio de 20 °C y monitoreados por el período de un año a través del empleo de la cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas, para utilizarlos como potenciales instrumentos en la resolución de disputas legales vinculadas al derrame de hidrocarburos y/o litigios por hurtos de estos recursos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras de crudo sometidas a meteorización en suelo

El crudo fue recolectado en el Yacimiento Del Mosquito (S 51°51'51" y O 68°57'7") perteneciente a la Cuenca Austral (Formación Springhill), provincia de Santa Cruz, Argentina. El mismo se caracterizó por una gravedad API de 32° a 15 °C (crudo liviano) y una salinidad de 52 g *m⁻³. Se transportó al laboratorio en una botella limpia de vidrio (un litro de capacidad color ámbar) para evitar la fotooxidación. En el llenado de la botella, se evitó la presencia de una cámara de aire para minimizar el impacto del oxígeno en la estabilidad del crudo y, además, prevenir su biodegradación. Luego fue almacenada en un lugar oscuro y seco a temperatura ambiente hasta la realización de la experiencia dentro de las siguientes 72 h (Tomas y Acuña, 2022).

2.2 Ensayo de meteorización en suelo

La muestra de suelo se tomó entre los 0 y 20 cm de profundidad respecto de la superficie tras eliminar la hojarasca de la estepa patagónica. Luego se colocó en una bolsa plástica y se almacenó a 4 °C hasta la preparación de los sistemas. El estudio de meteorización se llevó a cabo en 30 reactores a escala de laboratorio (frascos de vidrio transparentes de 300 ml de capacidad) monitoreados por el período de un año y repartidos equitativamente a lo largo de diez etapas. En cada uno de ellos se añadió 10 g de suelo y de forma progresiva 1 ml de crudo, con la ayuda de una espátula se distribuyó de forma homogénea el mismo, con el fin de garantizar el mayor esparcimiento de los hidrocarburos a lo largo de las partículas del suelo. Los reactores se dejaron abiertos, es decir, sin tapa a la temperatura ambiente promedio del laboratorio de 20 °C para que fenómenos tales como la fotooxidación, evaporación y biodegradación modificarán la composición química del hidrocarburo. El tiempo cero (T₀) se consideró para las muestras de crudo agregadas a los tres reactores iniciales y recuperadas inmediatamente para su análisis, es decir, a los cero días de comenzada la experiencia. El resto de las etapas integradas también por tres reactores se detallan a continuación: 7, 14, 21, 28, 60, 120, 180, 270 y 365 días constituyen los tiempos de análisis T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈ y T₉, respectivamente.

2.3 Obtención del crudo meteorizado

Cumplido los intervalos de tiempo de cada etapa, se procedió a extraer el crudo agregado a los reactores mediante el empleo de la extracción acelerada con disolventes (ASE) con el equipo Dionex ASE 150 "Thermo Scientific" con n-pentano como solvente de extracción. Las condiciones de extracción fueron: temperatura de celda de 175 °C con una presión de 1500 psi y un tiempo de extracción de 5 min en un único ciclo. Los extractos obtenidos se concentraron bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen de 10 ml, de cada una de ellos se recogió una alícuota de un 1 ml en viales independientes y se refrigeraron (extractos ASE). Los volúmenes restantes siguieron evaporándose hasta alcanzar los 0.5 ml, luego se sometieron a una separación por cromatografía de adsorción sólido-líquido en columna de vidrio (20 cm x 1.2 cm) empacada con 3 g de gel de sílice (activado a 150 °C durante un período de 24 h en la estufa), 50 mg de sulfato de sodio activado y 50 mg de alúmina activada. Para esta separación se sembraron los 0.5 ml de los extractos del suelo en la columna y posteriormente se eluyeron con 10 ml de n-pentano, para obtener la fracción de hidrocarburos alifáticos. Este extracto posteriormente se concentró hasta 0.5 ml bajo corriente de nitrógeno y, finalmente se almacenó a -15 °C hasta su análisis (Tomas y Acuña, 2022).

2.4 Identificación de biomarcadores por GC/MS

El análisis por GC/MS se llevó a cabo teniendo en cuenta las publicaciones de Tomas y Acuña (2022). Por cada muestra se inyectó en un cromatógrafo de gases, un µl del extracto ASE en modo Split y un µl del extracto alifático en modo Splitless. La separación se realizó en un equipo Agilent

modelo 7890A, con un detector de espectrometría de masas de la misma marca (modelo 5975C). Se utilizó una columna HP5ms de 30 m de largo, con un diámetro interno de 0.32 mm y un espesor de película de 0.25 μm . La temperatura del inyector se ajustó a 290 °C y se utilizó helio como gas acarreador con una velocidad de flujo de 1.2 ml/min⁻¹. El programa de temperatura utilizado fue el siguiente: temperatura inicial de 55 °C durante 2 min, seguido de una rampa de 6 °C /min⁻¹ hasta alcanzar los 270 °C, pasando directamente a otra rampa de 3 °C/min⁻¹ hasta alcanzar 300 °C, temperatura que se mantuvo durante 17 min. El tiempo total de corrida fue de 65 min. El detector de masas se utilizó con una temperatura de la fuente de iones y de la línea de transferencia de 230 °C y 180 °C, respectivamente y una energía de impacto de 70 eV. El escaneo de masas entre 30 y 400 una se realizó para obtener el cromatograma de iones totales (TIC) con el fin de determinar la distribución de n-parafinas y los isoprenoides acíclicos pristano y fitano. Por su parte, el monitoreo de iones seleccionados (modo SIM Scan) se utilizó para analizar los iones m/z = 191 (terpanos) y 217 (esteranos), en el extracto alifático. De esta manera se obtuvieron los fragmentogramas de interés correspondientes a cada muestra, haciendo uso del software "MSD ChemStation Data Analysis Application". A partir de los tiempos de retención, bibliografía de referencia e integración manual de los picos se identificaron los compuestos antes mencionados.

2.5 Análisis de los datos

Cada una de las diez etapas del ensayo estuvo integrada por tres reactores que se analizaron independientemente y cuyos valores se promediaron para eliminar así el efecto de la variabilidad analítica. Se calcularon 12 relaciones de diagnóstico (RDs) consideradas a partir de la literatura publicada por Fernández-Varela et al. (2010) derivadas de biomarcadores comúnmente utilizados en la identificación de fuentes de contaminación por hidrocarburos para evaluar su recalcitrancia frente a la meteorización. Además, en base al trabajo de Wang y Fingas (2003) se consideraron otros índices de diagnóstico generados a partir de n-alcanos, pristano y fitano. La desviación estándar relativa (DER) se empleó como indicador para evaluar la estabilidad de las moléculas frente a las condiciones de meteorización. Para esto se analizaron las RDs en función del tiempo de estudio a través de sus DERs obtenidas. Para que una RD se considere apta para su uso a lo largo del tiempo definido su DER debe ser menor al 5 % (Zhang et al., 2015).

3. RESULTADOS

3.1 Pristano, fitano y n-alcanos

El primer paso para determinar si se produjeron alteraciones en las muestras de hidrocarburos sometidas a las condiciones de laboratorio por el período de un año en reactores con suelo es fundamental observar los TICs correspondientes en cada una de las etapas del análisis. Cabe aclarar que por cuestiones prácticas y de límites de extensión del trabajo, solo se presentan los cromatogramas correspondientes a las etapas T0, T5, T7 y T9. Inicialmente se observó una distribución bimodal de los n-alcanos para el tiempo cero (T0), desde el undecano (n-C₁₁) hasta el triacontano (n-C₃₀; Figura 1). Durante el primer mes (T1-T4) no se visualizó un cambio apreciable en la composición de los n-alcanos, por otro lado, se evidenció un ligero levantamiento de la línea de base, lo cual es indicativo de un proceso de biodegradación incipiente sobre las muestras de crudo (Sutton et al., 2005). Luego de dos meses (T5) se consideró a la biodegradación y a la evaporación (Figura 1) como las responsables de la disminución total de los n-alcanos livianos undecano (n-C₁₁) y dodecano (n-C₁₂), y a los cuatro meses del tridecano (n-C₁₃). Además, se produjo la formación de una mezcla compleja no resuelta (MCNR) producto del aumento paulatino y progresivo de la línea de base. La presencia de MCNR o joroba en el cromatograma, es una típica evidencia de biodegradación y consiste en compuestos orgánicos que no pueden ser identificados en las condiciones de análisis utilizadas para la separación de los n-alcanos a través de los TICs (Sutton et al., 2005). A los seis meses del ensayo (T7) tuvo lugar la disminución del tetradecano (n-C₁₄) y el incremento de la MCNR (Figura 1). Es importante considerar que la fracción más liviana de n-alcanos generalmente es la primera en ser degradada por ser la de menor complejidad y de rápida metabolización por los microorganismos (Peters et al., 2005). Finalmente, a los 12 meses de la experiencia (T9) se observó un decrecimiento en las abundancias del heptadecano (n-C₁₇) y del octadecano (n-C₁₈) con respecto a los isoprenoides acíclicos pristano (P) y fitano (F), respectivamente (Figura 1). Este comportamiento es característico de un proceso mediado por microorganismos que produce la degradación de los alcanos lineales más fáciles de metabolizar a diferencia del P y el F que presentan una estructura ramificada (Peters et al., 2005).

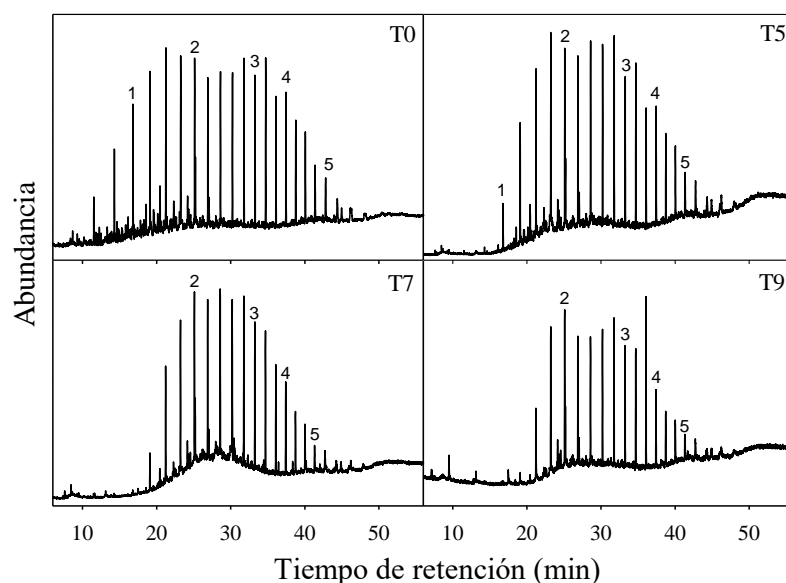


Figura 1. TICs para los crudos extraídos de suelo a los tiempos T0, T5, T7 y T9. 1: decano (n-C₁₀), 2: tridecano (n-C₁₃), 3: heptadecano (n-C₁₇), 4: docosano (n-C₂₂), 5: pentacosano (n-C₂₅), 6: octacosano (n-C₂₈).

3.2 Terpanos y esteranos

Los fragmentogramas correspondientes a los isoprenoides conocidos como terpanos (ion $m/z = 191$) se caracterizaron por no presentar cambios evidentes en cada una de las etapas comprendidas dentro de este análisis, con la salvedad de un leve incremento de la línea de base que no modificó la composición y distribución de estos biomarcadores (Figura 2). En detalle se detectaron las señales de los terpanos tricíclicos (C₂₃ y C₂₆), pentacíclicos (hopanos C₂₉ y C₃₀) y los hopanos extendidos (homohopanos C₃₁, C₃₂ y C₃₃). Cabe destacar que no se visualizó una disminución de los picos vinculados a los homohopanos (C₃₁ a C₃₃), compuestos susceptibles a la biodegradación y tampoco del resto de isoprenoides cíclicos pertenecientes al ion $m/z = 191$. En los yacimientos petrolíferos, la degradación de estos biomarcadores mediada por microorganismos tiene lugar por la pérdida de un grupo metilo, que da lugar a la formación de los 25-norhopanos u hopanos desmetilados (Peters et al., 2005), los cuales pueden identificarse a través del fragmentograma de masas asociado al ion $m/z = 177$. Estas moléculas no fueron observadas durante este ensayo, lo que refuerza los resultados obtenidos para los homohopanos (datos no presentados).

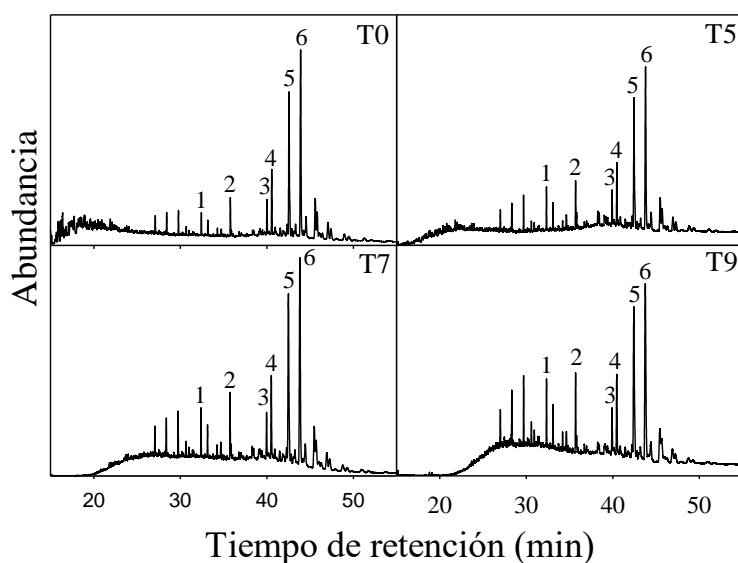


Figura 2. Fragmentogramas (ion $m/z = 191$) de los crudos extraídos del suelo a los tiempos T0, T5, T7, T9. 1: terpano tricíclico C₂₃ (T₂₃), 2: terpano tricíclico C₂₆ (T₂₆), 3: trisnorneohopano (Ts), 4: trisnorhopano (Tm), 5: norhopano C₂₉ (H₂₉), 6: hopano C₃₀ (H₃₀).

Por otro lado, en los fragmentogramas de masas para el ion $m/z = 217$, se observó un descenso de las abundancias relativas de los esteranos (C₂₇, C₂₈ y C₂₉) y de los diasteranos C₂₇ en función del pregnano C₂₁ y homopregnano C₂₂. Sin embargo, no se modificó la intensidad relativa del patrón de distribución de los esteranos regulares (C₂₇, C₂₈, C₂₉) en el transcurso de la experiencia (Figura 3).

Estos biomarcadores no presentaron un orden de alteración específico bajo las condiciones de ensayo al cabo de 12 meses, sin embargo, la intensidad de las señales entre C₂₁ y C₂₂ respecto a C₂₇, C₂₈ y C₂₉, sugiere una posible alteración por biodegradación (López e Infante, 2021). Es importante añadir que experiencias llevadas a cabo en el laboratorio sobre crudos estudiando el efecto de la meteorización mostraron que tanto los terpanos como los esteranos no fueron afectados por el fenómeno de evaporación, ya que estos biomarcadores se concentraron proporcionalmente en relación con el aumento de los porcentajes de degradación de los hidrocarburos (Wang y Fingas, 2003). Los resultados obtenidos muestran en mayor o menor medida la estabilidad de estos isoprenoides cíclicos bajo las condiciones de laboratorio en las cuales transcurrió este ensayo.

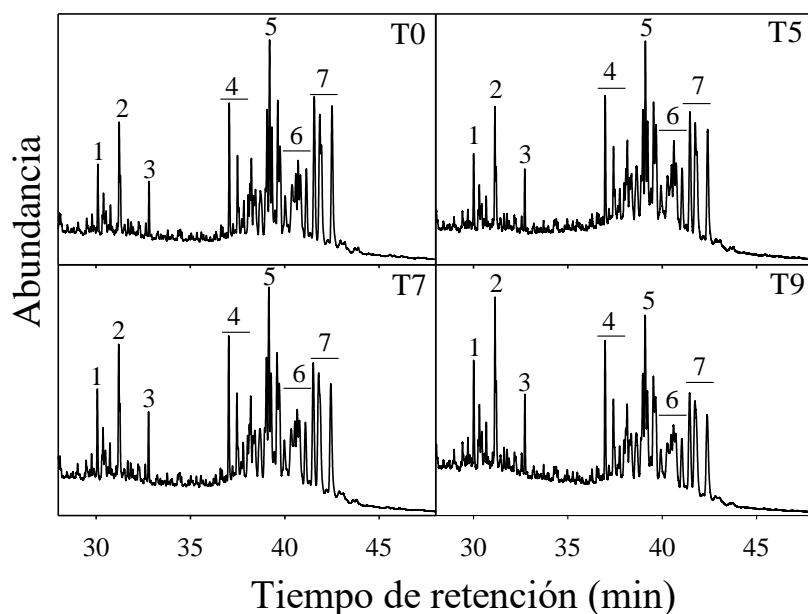


Figura 3. Fragmentogramas (ion $m/z = 217$) para los crudos extraídos del suelo a los tiempos T0, T5, T7, T9. 1: esterano C₂₀ (S₂₀), 2: esterano C₂₁ (S₂₁), 3: esterano C₂₂ (S₂₂), 4: diasteranos C₂₇ (D₂₇). 5: colestanos (S₂₇), 6: ergostanos (S₂₈), 7: estigmastanos (S₂₉).

3.3 Relaciones de diagnóstico (RDs)

La mayoría de las RDs presentadas en el Tabla 1 tuvieron valores de DER por debajo del 5 %, por consiguiente, se considera que estas relaciones no han sido afectadas por los factores fisicoquímicos y biológicos inherentes al ambiente en el que se desarrolló el ensayo (Zhang et al., 2015). A partir de las áreas se calcularon los cocientes P/n-C₁₇ y F/n-C₁₈ para ser empleados como índices de biodegradación, ya que los mismos consideran moléculas con grados de resistencia biológica diferente. En este sentido, el pristano y el fitano son más resistentes a la biodegradación que sus pares n-C₁₇ y n-C₁₈ (Peters et al., 2005). Como ambas relaciones sobrepasaron el 5 % de su DER se puede decir que ha tenido lugar el agotamiento preferencial de los hidrocarburos fácilmente degradables (n-C₁₇ y n-C₁₈) frente a los isoprenoides acíclicos P y F, indicio de que las muestras de crudo en suelo han sido biodegradadas. Por otro lado, la relación $(n-C_{13} + n-C_{14}) / (n-C_{25} + n-C_{26})$ asociada al proceso de evaporación exhibió un valor de DER próximo al 60 % (Tabla 1), lo cual puede explicarse por una mayor velocidad de evaporación de los alcanos n-C₁₃ y n-C₁₄ respecto a sus pares n-C₂₅ y n-C₂₆. Por otro lado, las RDs determinadas para los terpanos y esteranos (Tabla 1) presentaron DERs inferiores al 5 % en todos los casos, por lo tanto, se sugiere que estos indicadores no han sido afectados por la evaporación y la biodegradación que han tenido lugar durante la experiencia. Respecto a la primera, cuando la evaporación de un hidrocarburo tiene lugar, compuestos de elevada masa molecular como estos biomarcadores tienden a aumentar su concentración en el crudo residual sin modificar sus RDs (Wang et al., 2006). Por otro lado, la biodegradación no ha tenido el tiempo suficiente bajo las condiciones de ensayo para afectar pronunciadamente las abundancias relativas de estos isoprenoides cíclicos. La recalcitrancia tanto de terpanos como de esteranos fue documentada en investigaciones ambientales asociadas a vertidos de hidrocarburos *in situ* o en simulaciones llevadas a cabo en el laboratorio. Por ejemplo, un estudio publicado por (Zhang et al., 2015) que evaluó las 12 RDs de terpanos y esteranos presentadas en la Tabla 1, mostró que los cocientes no superaron el 5 % de la DER luego de tres meses de monitoreo.

Tabla 1. DERs para las muestras de crudo sometidas a meteorización en suelo.

RDs	DERs	RDs	DERs
Pristano/Fitano = P/F	2,07 %	Moretano/Hopano $C_{29} = M_{30}/H_{29}$	4,96 %
Pristano/Heptadecano = P/n-C ₁₇	7,61 %	Homohopanos = C ₃₁ R/C ₃₁ S	3,67 %
Fitano/Octadecano = F/n-C ₁₈	8,24 %	Diasterano C ₂₇ βR / Hopano C ₃₀	3,83 %
(n-C ₁₃ + n-C ₁₄) / (n-C ₂₅ + n-C ₂₆)	59,6 %	Diasteranos = C ₂₇ βS/C ₂₇ βR	1,64 %
Trisnorhopano/Hopano C ₃₀ = T _S /H ₃₀	4,77 %	Estigmastanos C ₂₈ α(R + S) / Hopano C ₃₀	4,60 %
Gammacerano/Hopano C ₃₀ = G ₃₀ /H ₃₀	3,40 %	Diasterano C ₂₇ βR / Estigmastano C ₂₉ αS	3,80 %
Moretano/ Hopano C ₃₀ = M ₃₀ /H ₃₀	2,48 %	Estigmastano C ₂₉ αS / Hopano C ₃₀	3,68 %
Trisnorhopano/Trisnorneohopano = T _S /T _m	4,96 %	Estigmastanos = C ₂₉ αS/C ₂₉ α(R + S)	1,85 %

4. CONCLUSIONES

Los resultados indican que durante este ensayo de meteorización de crudo en suelo a escala de laboratorio durante el lapso de 12 meses han tenido lugar dos procesos que modificaron la composición de las muestras. Uno de ellos fue el fenómeno de evaporación que ha promovido una disminución de los n-alcenos livianos y de la relación $(n-C_{13} + n-C_{14})/(n-C_{25} + n-C_{26})$. El otro proceso que generó cambios en los hidrocarburos fue la biodegradación, la cual se asoció a un levantamiento de la línea de base en los TIC que derivó en la formación de MCNR. También produjo que los valores de DERs de los cocientes P/C₁₇ y F/C₁₈ se ubicaran por encima del límite permitido. Sin embargo, la mayoría de los biomarcadores permanecieron inalterados bajo las condiciones de ensayo a lo largo del tiempo de estudio lo que demuestra su potencial para ser aplicado a situaciones reales en entornos continentales que involucren vertidos de crudo accidentales y/o intencionales, ya que constituyen una firma química única conocida como huella dactilar que identifica a cada crudo.

5. REFERENCIAS

- Fernández-Varela R., Andrade J., Muniategui S., Prada D. (2010). Selecting a reduced suite of diagnostic ratios calculated between petroleum biomarkers and polycyclic aromatic hydrocarbons to characterize a set of crude oils. *Journal of Chromatography A*, 1217, 8279-8289.
- Kao N., Su M., Fan J., Chung Y. (2015). Identification and quantification of biomarkers and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aged mixed contaminated site: from source to soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), 7529-7546.
- Kienhuis P., Kraus U., Kooistra K. (2019). *Oil identification*. In: Worsfold P, Townshend A, Poole C, Miro M, editors. *Encyclopedia of Analytical Science*, UK: Academic Press; p. 45-52.
- López L., Infante C. (2021). Cambios en los biomarcadores de la fracción de hidrocarburos saturados en un ensayo de biorremediación con un crudo extrapesado. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 37, 119-131.
- Peters K., Walters C., Moldowan J. (2005). *The Biomarker Guide. Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History*, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Prince R., Garrett R., Bare R., Grosman M., Townsend T. (2003). The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils. *Spill Science Technology Bulletin*, 8, 145-156.
- Service C., Nelson T., Paquet P., McInnes W., Chris T. (2012). Pipelines and parks: evaluating external risks to protected areas from the proposed Northern Gateway Oil Transport Project. *Natural Areas Journal*, 32, 367-376.
- Sutton P., Lewis C., Rowland, S. (2005). Isolation of individual hydrocarbons from the unresolved complex hydrocarbon mixture of a biodegraded crude oil using preparative capillary gas chromatography. *Organic Geochemistry*, 36, 963-970.
- Tomas G., Acuña A. (2022). Biomarcadores aplicados al estudio de crudos extraídos de la Formación Magallanes, Cuenca Austral, Argentina. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 74(1), A160621.
- Wang Z., Fingas M. (2003). Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 47(9-12), 423-452.
- Wang Z., Stout S., Fingas M. (2006). Forensic fingerprinting of biomarkers for oil spill characterization and source identification. *Environmental Forensics*, 7, 105-146.
- Yavari S., Malakahmad A., Sapari N. (2015). A review on phytoremediation of crude oil spills. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(8).
- Zhang H., Yin X., Zhou H., Wang J., Han L. (2015). Weathering Characteristics of Crude Oils from Dalian Oil Spill Accident, China. *Aquatic Procedia*, 3, 238-244.