

07TCQA - Estabilidad ambiental de biomarcadores del petróleo en suelo y agua de mar

Environmental stability of crude oil biomarkers in soil and seawater

Germán Javier Tomas^{1,2}, Adrián Javier Acuña².

1. Centro de Investigación y Transferencia de la Provincia de Santa Cruz, Río Gallegos, Argentina.
2. Facultad Regional Santa Cruz, Universidad Tecnológica Nacional, Río Gallegos, Argentina.
germanjaviertomas@frsc.utn.edu.ar

Resumen

En el petróleo existe un grupo de moléculas conocidas como biomarcadores capaces de permanecer estables durante las agresivas condiciones en las que aquel se forma. En el presente trabajo se analizó la estabilidad ambiental de los biomarcadores de un crudo sometido a intemperización artificial en agua de mar y suelo, con el objetivo de probar su utilidad en problemáticas vinculadas a derrames y/o hurtos de petróleo. Para tal fin, se analizaron los perfiles de biomarcadores por GC/MS a partir del crudo previamente tratado con sílica gel en primer lugar y de su fracción alifática obtenida mediante separación por cromatografía sólido-líquido en columna en segunda instancia. Parámetros específicos tales como P/F, P/n-C₁₇, F/n-C₁₈, G₃₀/H₃₀, M₃₀/H₃₀ y M₃₀/H₂₉ se modificaron en torno a valores menores del 5% respecto de su desviación estándar relativa para un período de nueve meses. Estos resultados, más el análisis de los cromatogramas obtenidos, indicó que el proceso de meteorización predominante sobre la composición general del crudo fue la evaporación, sin embargo, los biomarcadores permanecieron inalterados a lo largo del tiempo de estudio lo que demuestra su efectividad en la resolución de los problemas antes mencionados.

Palabras clave: biomarcadores, agua de mar, suelo, crudo.

Abstract

In oil there is a group of molecules known as biomarkers capable of remaining stable during the aggressive conditions in which it is formed. In the present work, the environmental stability of biomarkers of a crude oil subjected to artificial weathering in seawater and soil was analysed, with the aim of testing their usefulness in problems related to oil spills and/or oil thefts. To this end, the biomarker profiles were analysed by GC/MS from the crude oil previously treated with silica gel in the first instance and its aliphatic fraction obtained by solid-liquid chromatography column separation in the second instance. Specific parameters such as P/F, P/n-C₁₇, F/n-C₁₈, G₃₀/H₃₀, M₃₀/H₃₀ and M₃₀/H₂₉ changed around values less than 5% of their relative standard deviation for a period of nine months. These results plus the analysis of the chromatograms obtained indicate that the predominant weathering process on the overall composition of the crude oil was evaporation, however, the biomarkers remained unchanged throughout the study time which demonstrates their effectiveness in solving the problems mentioned above.

Keywords: biomarkers, seawater, soil, crude oil.

1. Introducción

Los depósitos hidrocarbúrficos no están distribuidos de forma equitativa en el planeta, pero su demanda es elevada especialmente en la mayoría de los países industrializados, por lo que el transporte internacional a través del mundo requiere principalmente de barcos. En consecuencia, este consumo excesivo de petróleo genera impactos negativos sobre el ser humano y el medio ambiente, ya sea de forma indirecta, por las emisiones de CO₂, o directamente por los posibles vertidos de crudo y/o sus derivados (Price, 1995). Cuando se produce este tipo de siniestros, inicia un mecanismo de defensa natural en los ecosistemas afectados conocido como meteorización, el cual promueve la remediación de las zonas afectadas por los componentes del crudo (Wang *et al.*, 2007). Este es un proceso físico, geoquímico y biológico que altera la composición de este recurso no renovable. Tanto en la geoquímica del petróleo como en los estudios de impacto ambiental, el conocimiento de mecanismos, los tiempos de permanencia y los intermediarios químicos son esenciales para describir las bases científicas y técnicas de este fenómeno (Reyes *et al.*, 2014). Los estudios más recientes informan de los mecanismos implicados en la degradación de petróleo, y es bien sabido que, de acuerdo con la naturaleza de este el proceso de desgaste diferirá. Además de las características fisicoquímicas, también influyen los factores biofísico-geoquímicos alrededor de la zona afectada (Ron y Rosenberg, 2014). Todos los componentes del petróleo pueden ser alterados física y geoquímicamente por factores bióticos y abióticos aún en la roca yacimiento, durante los procesos de exploración y/o transporte y posibles vertidos (Joo *et al.*, 2013). Sin embargo, existen unas moléculas conocidas como biomarcadores capaces de resistir en menor o mayor medida procesos de meteorización tales como biodegradación, dispersión, emulsión, evaporación, fotooxidación y deposición que actúan sinérgicamente, descomponiendo, deteriorando u oxidando los componentes del petróleo (Cai *et al.*, 2013). Los biomarcadores son moléculas complejas presentes en el petróleo que se caracterizan por una elevada estabilidad térmica durante las etapas que originan el crudo (Peters *et al.*, 2005). Esa propiedad intrínseca está asociada a la estructura química de cada uno de los biomarcadores, permaneciendo sin grandes cambios moleculares, respecto de sus precursores biológicos (Killips y Killops, 2005).

La meteorización del petróleo puede evaluarse de tres maneras diferentes: 1) por la presencia o ausencia de sus componentes (Wang y Stout, 2007); 2) por la abundancia molecular relativa del

petróleo (Reyes *et al.*, 2014) y 3) de forma paramétrica, utilizando relaciones entre alturas, áreas o concentraciones de biomarcadores y/o compuestos de interés geoquímico (Stout *et al.*, 2009). Esto constituye la base de los análisis ambientales relacionados al derrame de petróleo, ya que los biomarcadores tienen la capacidad de resistir bajo la intemperie y vincular potenciales fuentes de contaminación o diferenciar entre distintos tipos de crudos involucrados en el suceso. En la mayoría de los casos, la coincidencia o no en la distribución de biomarcadores, es una fuerte evidencia para la correlación positiva o negativa del crudo derramado y las fuentes potenciales. Sin embargo, lo expuesto anteriormente no es concluyente, debido a que, en las zonas de meteorización, los patrones de distribución se modifican perdiendo su información original, haciendo más difícil la correlación y generando la necesidad del uso de otras herramientas (Wang *et al.*, 2006). La meteorización afecta el estado de diferentes biomarcadores y compuestos del crudo (Wang y Stout, 2007) y su abundancia molecular indica el nivel de meteorización y el tiempo de permanencia de determinados petróleos. En general, los biomarcadores retienen gran cantidad de información del crudo original, y esta similitud estructural revela información bien específica sobre la fuente del crudo derramado. Por lo tanto, las características químicas de la fuente y de los biomarcadores persistentes a la meteorización, proporcionan información de gran importancia para las investigaciones forenses ambientales al momento de determinar la fuente, diferenciar y correlacionar crudos (Wang *et al.*, 2007).

2. Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue demostrar la estabilidad de los biomarcadores de una muestra de crudo frente a los procesos de meteorización que se producen en suelo y agua de mar en un período de tiempo de nueve meses para utilizarlos como herramientas de validez en litigios por hurtos o derrames de crudo.

3. Materiales y métodos

La muestra de crudo fue recolectada en el Yacimiento Del Mosquito (51°51'51"S, 68°57'7"W) perteneciente a la Cuenca Austral (Formación Springhill). 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 cámara de aire para minimizar el impacto del oxígeno en la estabilidad de la muestra y 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.

3.1 Crudo en agua de mar

El estudio se dividió en dos, de acuerdo con la naturaleza del sistema en el que se introdujo el petróleo. En primer lugar, se añadieron 100 ml de agua de mar en 15 frascos de vidrio transparentes de 300 ml de capacidad. Posteriormente se agregó 1 ml de crudo con pipeta Pasteur en cada uno de ellos y se agitaron los sistemas formados con varilla de vidrio. Los frascos se dejaron durante un período de tiempo previamente establecido a la intemperie (Tabla 1) para que fenómenos de meteorización tales como fotooxidación, evaporación y biodegradación modificarán la composición química del crudo.

Tabla 1. Tiempos de permanencia de los crudos.

Tiempo	Denominación	Frascos
0 días	T0	3
2 meses	T1	3
4 meses	T2	3
6 meses	T3	3
9 meses	T4	3

Cumplido el tiempo de permanencia de las muestras de crudo en tales condiciones se procedió a extraerlas del sistema acuoso. Se adicionó mediante pipeta aforada 10 ml de n-pentano. Posteriormente se trasvasó con el apoyo de un embudo de vidrio la mezcla (agua de mar – n-pentano – crudo) a una ampolla de decantación de 200 ml. Una vez estabilizado el sistema, se recogió primero el agua (más densa) en el frasco de vidrio y luego la fase oleosa (crudo + n-pentano) en un vial. Teniendo en consideración trabajos tales como Stashenko *et al.* (2014) y Tomas *et al.* (2020), se llevó a cabo la obtención de la fracción alifática a partir de las muestras de crudo mediante el empleo de cromatografía de adsorción sólido-líquido en columna. Las muestras contenidas en los viales se sometieron a una separación 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 horas en la estufa), al que se le adicionó 50 mg de sulfato de sodio activado y 50 mg de alúmina activada en su parte superior. Se sembraron aproximadamente 100 µl de crudo en la columna y luego se eluyeron con 10 ml de n-pentano, para obtener el extracto de hidrocarburos saturados. La fracción se concentró hasta 0,5 ml bajo corriente de nitrógeno, se transfirió a un vial, y se almacenó a -15°C hasta su análisis.

3.2 Crudo en suelo

El procedimiento aplicado a las muestras de crudo en el sistema sólido en general fue similar al descrito en el punto 3.1 pero con ciertas diferencias que se describen a continuación:

- En los frascos de vidrio se colocaron 10 g de suelo. Para garantizar una distribución homogénea a lo largo del suelo, se hizo uso de espátula y el crudo (1 ml) se añadió minuciosamente.
- El crudo adsorbido a la fase litosférica fue extraído mediante el empleo de la extracción acelerada con disolventes (ASE) usando el equipo *Dionex ASE 150* “Thermo Scientific”. Las condiciones de extracción fueron: 175°C la temperatura de la celda, 1500 psi de presión, 5 min el tiempo de extracción y un ciclo. El extracto obtenido se concentró bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen de 0,5 ml, y se transfirió a un vial.
- Para la obtención de la fracción alifática, en la columna se sembraron los 0,5 ml de extracto.

3.3 Análisis por GC/MS

El análisis mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) se llevó a cabo teniendo en cuenta las publicaciones de Stashenko *et al.* (2014) y Tomas *et al.* (2020). Se inyectó en un cromatógrafo de gases un µl de los extractos alifáticos 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 uma 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 usó para analizar los iones $m/z = 191$ (terpanos) y 217 (esteranos). 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 semicuantitativamente los n-alcenos y los biomarcadores.

3.4 Reproducibilidad del análisis

Para la identificación de las señales y la selección de las relaciones de diagnóstico (RD) a evaluar se siguió lo planteado en la norma europea CEN/TR 15522-2. En general en la Norma, los compuestos que se incluyen para poder identificar la fuente de un derrame o comparar si dos muestras pertenecen a una misma fuente original contemplan compuestos específicos y diversos que se mantienen estables durante los procesos de envejecimiento y biodegradación del crudo, por tal motivo se utilizaron biomarcadores (terpanos y esteranos; Comité Europeo de Normalización, 2009). Todos los crudos se analizaron por triplicado tanto en agua de mar como en suelo en cada uno de los 5 períodos de tiempo definidos para la experiencia, para eliminar el efecto de la variabilidad analítica y la heterogeneidad de las muestras. La desviación estándar relativa (RSD) se empleó como indicador para evaluar la estabilidad de las relaciones de diagnóstico (Zhang *et al.*, 2015).

3.5 Análisis de datos

Las relaciones de diagnóstico derivadas de los n-alcenos y de los biomarcadores han sido utilizadas desde 1990 para identificar fuentes de petróleo, vigilar procesos de degradación biológica e interpretar datos químicos asociados a vertidos de petróleo. La metodología implicada fue de tipo semicuantitativa, lo que permitió inducir un efecto de auto normalización sobre los datos y evitar así una laboriosa cuantificación de un número impráctico de sustancias (Wang *et al.*, 2006). De acuerdo con la literatura publicada por Fernández-Varela *et al.* (2010), se calcularon 12 relaciones de diagnóstico (Tabla 2 y 3) derivadas de hopanos y esteranos comúnmente utilizados para la identificación de fuentes de contaminación por hidrocarburos, con el fin de evaluar su recalcitrancia frente a los procesos de meteorización. Además, en base a trabajos de Wang *et al.* (2000) y Lemkau *et al.* (2010) se consideraron índices de diagnóstico generados a partir de alcanos e isoprenoides (Tabla 2 y 3). Para

demostrar la estabilidad ambiental de los biomarcadores frente a las condiciones de meteorización se analizaron las relaciones de diagnóstico en función del tiempo a través de la desviación estándar relativa (DSR). Para que una relación de diagnóstico se considere estable a lo largo del tiempo definido debe ser menor al 5 % (Zhang *et al.*, 2015).

4. Resultados y Discusión

Una primera aproximación para determinar si existieron modificaciones en la composición del crudo es mediante la visualización del TIC y de los fragmentogramas correspondientes a lo largo del tiempo de estudio. Para las muestras de crudo extraídas del sistema acuoso en el tiempo cero (T₀) se observó una distribución bimodal de los n-alcenos, la cual empezó con el nonano (n-C₉) y terminó con el triacotano (n-C₃₀; Figura 1A). A los dos meses (T₁, meteorización inicial) el proceso dominante ha sido la evaporación evidenciada por un levantamiento de la línea de base en el TIC y una pérdida de alcanos hasta el dodecano (n-C₁₂) (Figura 1B). La mayoría de las muestras vinculadas a un vertido de crudo en China recogidas luego de tres meses estaban ligeramente erosionadas, y sólo faltaba la fracción de alcanos normales que van de n-C₈ a n-C₁₃ (Yim *et al.*, 2011). Durante T₂, T₃ y T₄ (cuatro, seis y nueve meses, respectivamente) los cambios se agudizaron ligeramente en esa tendencia sin el significativo aporte de otro fenómeno de meteorización. En este intervalo de tiempo el crudo perdió los alcanos n-C₁₃ a n-C₁₅ (meteorización moderada), lo cual es característico de derrames en agua donde las moléculas más livianas de este tipo se pierden por evaporación, debido a sus bajos pesos moleculares, durante los primeros meses de producido el derrame (Peters y Moldowan, 1993).

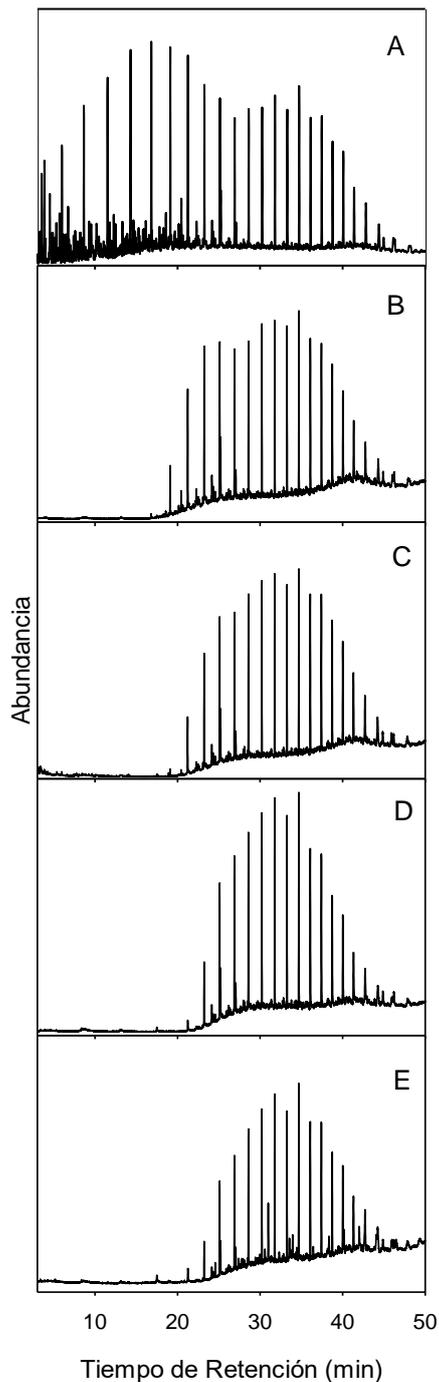


Figura 1. TIC para los crudos extraídos de agua de mar a los tiempos T0 (A), T1 (B), T2 (C), T3 (D) y T4 (E).

Respecto a los fragmentogramas, para el ion $m/z = 191$ se observó un levantamiento de la línea de base sin modificaciones en la composición de los terpanos (Figura 2) y para el ion $m/z = 217$ correspondiente a los esteranos no se visualizaron cambios apreciables (Figura 3).

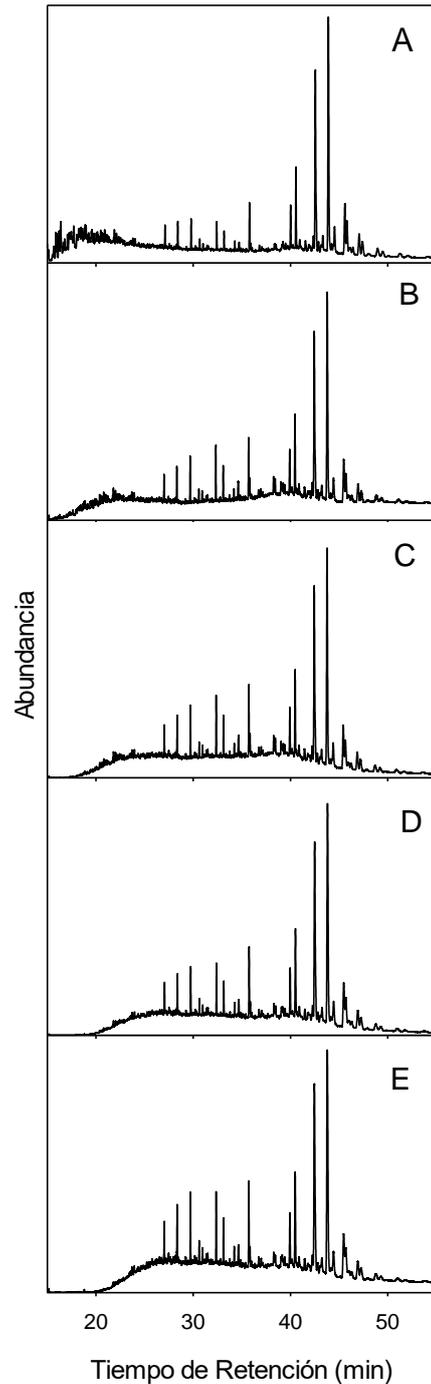


Figura 2. Fragmentogramas para el ion $m/z = 191$ de los crudos extraídos de agua de mar a los tiempos T0 (A), T1 (B), T2 (C), T3 (D) y T4 (E).

Estudios de laboratorio asociados al hopano H_{30} expusieron una elevada recalcitrancia de este frente a fenómenos de biodegradación o de fotooxidación (Aeppli *et al.*, 2014). Su degradación biológica y la de otros biomarcadores se ha logrado en condiciones agresivas de laboratorio utilizando cultivos de enriquecimiento aeróbico (Douglas *et al.*, 2012). Por lo cual cabría esperar que los biomarcadores permanecieran invariables en el tiempo, ya que la evaporación ha

sido el factor de desgaste predominante y estos no se ven afectados por la misma debido a sus elevados pesos moleculares (Peters *et al.*, 2005).

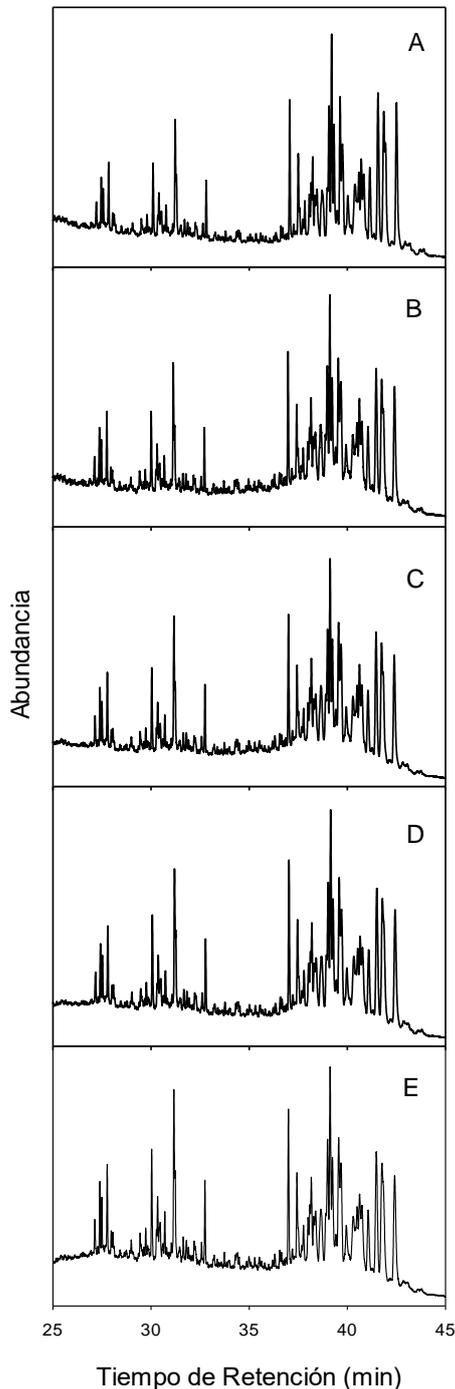


Figura 3. Fragmentogramas para el ion $m/z = 217$ de los crudos extraídos de agua de mar a los tiempos T0 (A), T1 (B), T2 (C), T3 (D) y T4 (E).

Finalmente, los resultados cuantitativos durante las simulaciones controladas en el laboratorio de un crudo expuesto a agua de mar, produjo disminuciones relativas de las cadenas alifáticas de menor peso molecular en el rango de n-alcenos ($n-C_{11}$ a $n-C_{15}$). Por otro lado, en los n-alcenos $> n-C_{15}$

y en los biomarcadores no se observaron disminuciones significativas después de 15 semanas (Agüero, 2019).

Los crudos que interactuaron con el suelo se caracterizaron por una distribución similar a la descrita para el agua, pero con abundancias menores para los n-alcenos de nueve hasta doce carbonos (Figura 4A). Esta diferencia se debió a la manipulación del crudo agregado al suelo previa extracción para determinar T0. Luego de dos meses (T1) hubo una pérdida de n-alcenos livianos, pero menos acusada que en el sistema acuoso (Figura 4B) debido a la adsorción del crudo a las partículas del suelo (Peters *et al.*, 2005). Además, se produjo una elevación de la línea de base que se acentuó durante T2 por la desaparición de los n-alcenos hasta el tetradecano ($n-C_{14}$) y la aparición de una mezcla compleja no resuelta “UCM” (Figura 4C), la cual se incrementó en T3 y se estabilizó en T4 (Figura 4D-E). De acuerdo con estos resultados la evaporación nuevamente ha sido el factor determinante en la modificación del TIC sugerido a partir de la disminución relativa en la concentración de n-alcenos livianos y los bajos valores de las relaciones $P/n-C_{17}$ y $F/n-C_{18}$ (Tabla 2 y 3; Peters y Moldowan 1993). Sin embargo, es importante destacar la aparición de la “UCM” asociada a una biodegradación incipiente promovida por la comunidad microbiana autóctona del suelo y de los nutrientes que inicialmente hayan estado presentes en el mismo (Zhang *et al.*, 2015). En el caso de los fragmentogramas para los iones $m/z = 191$ y 217 , no se observó la modificación de terpanos y esteranos, respectivamente a pesar de que partir de T3 y T4 se presentó un ligero levantamiento de la línea de base (los fragmentogramas no se presentan debido a su semejanza con las Figuras 2 y 3). Crudos derramados en las playas del Golfo de México sometidos a una meteorización natural habían modificado su composición inicial luego de 18 meses de producido el siniestro. Las muestras de arena impregnadas de petróleo habían perdido compuestos volátiles debido a la evaporación, incluyendo todos los compuestos con menos de 15 carbonos. Sin embargo, los esteranos y los hopanos fueron menos afectados, representando un enriquecimiento relativo de los biomarcadores en los crudos erosionados (Aeppli *et al.*, 2012). Encontraron que los terpanos y esteranos fueron recalcitrantes a la meteorización en la escala temporal investigada. Por lo tanto, concluyeron que el uso de relaciones de diagnóstico a partir de estos era válido para distinguir el petróleo de fuentes distintas (Aeppli *et al.*, 2012). Un experimento de vertido de petróleo en las Antillas Menores luego de ocho años dio como resultado la reducción en un 25 % de terpanos y esteranos (Munoz *et al.*, 1997) y se hicieron observaciones

similares 20 años después en otro vertido artificial de petróleo en el Ártico (Prince *et al.*, 2002).

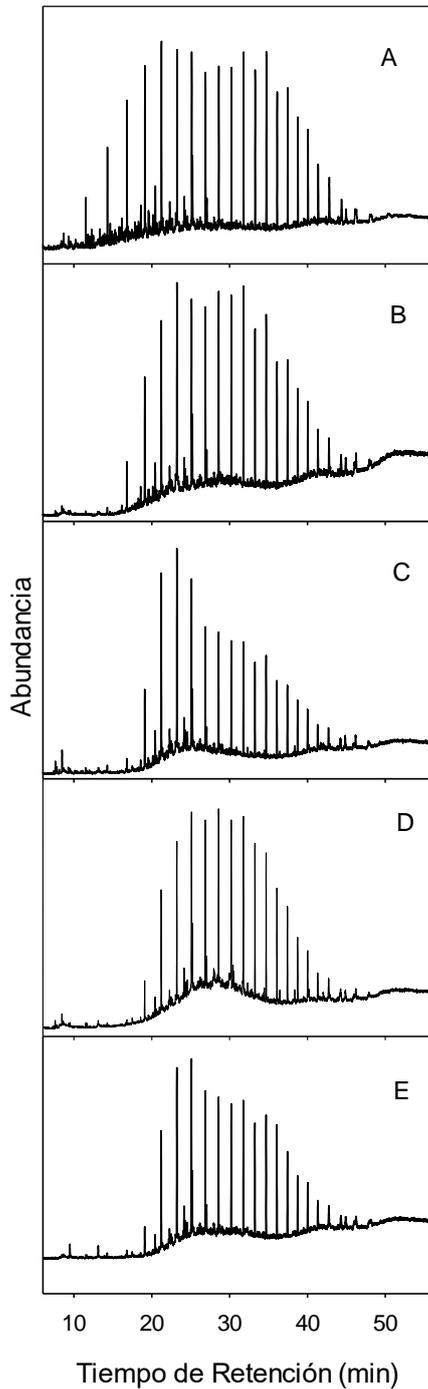


Figura 4. TIC para los crudos extraídos de suelo a los tiempos T0 (A), T1 (B), T2 (C), T3 (D) y T4 (E).

Las relaciones de diagnóstico determinadas para las muestras tanto para agua como para suelo (Tabla 2 y 3) se situaron por debajo del 5% de la desviación estándar relativa. Si los índices son inferiores al 5%, significa que los mismos no han sido afectados por la intemperie, mientras que más

del 5% sugiere que la meteorización tuvo efecto (Zhang, *et al.*, 2015). Estos resultados se vinculan a cambios poco significativos a lo largo del tiempo en el cual se llevó a cabo el estudio. Cuando la evaporación es el fenómeno predominante en un proceso de desgaste, moléculas semejantes pasan al estado gaseoso con la misma tendencia conservando la relación de diagnóstico (Peters *et al.*, 2005). Por lo tanto, los valores de %DSR no deberían haberse modificado sustancialmente tal cual lo muestran los resultados obtenidos.

Tabla 2. Relaciones de diagnóstico de las muestras de crudo en agua.

RD	T0	T1	T2	T3	T4	DSR
P / F	1,85 ± 0,19	1,90 ± 0,04	1,85 ± 0,19	1,84 ± 0,09	1,93 ± 0,08	4,7 %
P / n-C ₁₇	0,42 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,50 ± 0,04	0,44 ± 0,01	2,9 %
F / n-C ₁₈	0,26 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0	0,18 ± 0,02	2,4 %
Ts / H ₃₀	0,10 ± 0	0,12 ± 0	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0	0,12 ± 0	0,7 %
G ₃₀ / H ₃₀	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,02 ± 0,01	0,5 %
M ₃₀ / H ₃₀	0,08 ± 0	0,08 ± 0	0,08 ± 0	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0	0,2 %
Ts / Tm	0,49 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,50 ± 0,02	0,50 ± 0	0,05 ± 0,01	0,7 %
M ₃₀ / H ₂₉	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0	2,8 %
H ₃₁ (R) / H ₃₁ (S)	0,57 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,57 ± 0,01	1,4 %
D ₂₇ ba (R) / H ₃₀	0,03 ± 0	0,04 ± 0	0,04 ± 0	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0	0,4 %
D ₂₇ ba (S) / D ₂₇ ba (R)	2,34 ± 0,03	2,32 ± 0,14	2,33 ± 0,04	2,30 ± 0,04	2,35 ± 0,08	1,8 %
S ₂₈ abb (R + S) / H ₃₀	0,05 ± 0	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0	0,05 ± 0	0,04 ± 0	0,8 %
D ₂₇ ba (R) / S ₂₉ aaa (S)	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,29 ± 0,03	0,28 ± 0,01	3,2 %
S ₂₉ aaa (S) / H ₃₀	0,14 ± 0	0,16 ± 0	0,18 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	2,2 %
S ₂₉ aaa (S) / S ₂₉ abb (R + S)	2,30 ± 0,10	2,24 ± 0,13	2,26 ± 0,19	2,24 ± 0,10	2,23 ± 0,07	3,1 %

P/F = pristano/fitano; P/n-C₁₇ = pristano/heptadecano; F/n-C₁₈ = fitano/octadecano; Ts/H₃₀ = trisnorhopano/hopano C₃₀; G₃₀/H₃₀ = gammacerano/hopano C₃₀; M₃₀/H₃₀ = moretano/hopano C₃₀; Ts/Tm = trisnorhopano/ trisnorneohopano; M₃₀/H₂₉ = moretano/hopano C₂₉; H₃₁ (R)/H₃₁ (S) = homohopano (R)/homohopano (S); D₂₇ ba (R)/H₃₀ = diasterano C₂₇/hopano C₃₀; D₂₇ ba (S)/D₂₇ ba (R) = diasterano C₂₇ (S)/diasterano C₂₇ (R); S₂₈ abb (R + S) / H₃₀ = ergostano C₂₈/ hopano C₃₀; D₂₇ ba (R)/S₂₉ aaa (S) = diasterano C₂₇/estigmastano C₂₉; S₂₉ aaa (S) / H₃₀ = estigmastano C₂₉/hopano C₃₀; S₂₉ aaa (S)/S₂₉ abb (R + S) = estigmastano C₂₉/ estigmastano C₂₉ (R + S)

Environmental Science Technology 46 (16), 8799–8807.

Tabla 3. Relaciones de diagnóstico de las muestras de crudo en suelo.

RD	T0	T1	T2	T3	T4	DSR
P / F	2,08 ± 0,05	2,01 ± 0,05	2,11 ± 0,04	1,99 ± 0,06	2,06 ± 0,07	3,8 %
P / n-C ₁₇	0,44 ± 0,04	0,43 ± 0,01	0,39 ± 0,04	0,40 ± 0,02	0,48 ± 0,02	2,9 %
F / n-C ₁₈	0,23 ± 0	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,28 ± 0,02	1,8 %
Ts / H ₃₀	0,11 ± 0	0,10 ± 0	0,11 ± 0	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,4 %
G ₃₀ / H ₃₀	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0	0,5 %
M ₃₀ / H ₃₀	0,08 ± 0	0,08 ± 0	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0	0,5 %
Ts / Tm	0,49 ± 0	0,48 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,5 %
M ₃₀ / H ₂₉	0,17 ± 0	0,18 ± 0	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,13 ± 0,01	2,4 %
H ₃₁ (R) / H ₃₁ (S)	0,58 ± 0	0,54 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,45 ± 0,01	4,5 %
D ₂₇ ba (R) / H ₃₀	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0	0,2 %
D ₂₇ ba (S) / D ₂₇ ba (R)	2,33 ± 0,07	2,33 ± 0,05	2,31 ± 0,07	2,31 ± 0,09	2,35 ± 0,14	4,1 %
S ₂₈ abb (R + S) / H ₃₀	0,06 ± 0	0,05 ± 0	0,05 ± 0	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0	0,6 %
D ₂₇ ba (R) / S ₂₉ aaa (S)	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,9 %
S ₂₉ aaa (S) / H ₃₀	0,15 ± 0	0,14 ± 0	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0	0,6 %
S ₂₉ aaa (S) / S ₂₉ abb (R + S)	2,21 ± 0,12	2,23 ± 0,02	2,24 ± 0,12	2,12 ± 0,05	2,23 ± 0,12	4,3 %

*Idem tabla 2.

5. Conclusiones

Este estudio demuestra la estabilidad de los biomarcadores en el período de tiempo investigado y bajo las condiciones a las que fueron sometidas las muestras. Por lo tanto, el uso de pristano, fitano, terpanos y esteranos es adecuado para tomar huellas dactilares de crudos para ser empleados en la identificación de petróleos robados o derramados accidental y/o intencionalmente debido a que constituyen una firma química fiable y única para cada crudo.

6. Referencias

Aeppli, C. y otros siete autores, (2012). *Oil weathering after the Deepwater Horizon disaster led to the formation of oxygenated residues,*

Aeppli, C. y otros cinco autores, (2014). *Recalcitrance and degradation of petroleum biomarkers upon abiotic and biotic natural weathering of deepwater horizon oil,* Environmental Science and Technology 48, 6726 – 6734.

Agüero Manzano, Y.M. (2019). *Las relaciones isotópicas de compuestos específicos de hidrocarburos (CSIA) aplicada en las ciencias forenses ambientales asociadas a los derrames petroleros marinos,* Tesis de Maestría, Área de Ingeniería, Universidad Católica Andrés Bello, Caracas, Venezuela.

Cai, M.M. y otros cuatro autores, (2013). *Aerobic Biodegradation Process of Petroleum and Pathway of Main Compounds in Water Flooding Well of Dagang Oil Field,* Bioresource Technology 144, 100-106.

Comité Europeo de Normalización (2009). *Oil spill identification — Waterborne petroleum and petroleum products — Part 2: Analytical methodology and interpretation of results based on GC-FID and GC-MS low resolution analyses* (136), Comité Europeo de Normalización.

Douglas, G. S. y otros tres autores, (2012). *Laboratory and field verification of a method to estimate the extent of petroleum biodegradation in soil.* Environmental Science Technology 46 (15), 8279–8287.

Fernández-Varela, R. y otros tres autores, (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.

Joo, C. y otros diez autores, (2013). *Mesocosm Study on Weathering Characteristics of Iranian Heavy Crude Oil with and without Dispersants,* Journal of Hazardous Materials 248-249, 37-46.

Killops, S.D.; Killops, V.J. (2005). *Introduction to Organic Geochemistry,* 2^a ed. Blackwell Publishing, Nueva Jersey, Estados Unidos.

Lemkau, K.L. y otros cinco autores, (2010). *The M/V Cosco Busan spill: source identification and short-term fate,* Marine Pollution Bulletin 60, 2123 – 2129.

- Munoz, D. y otros cinco autores, (1997). Long term evolution of petroleum biomarkers in mangrove soil (Guadeloupe). *Marine Pollution Bulletin* 34 (11), 868 – 874.
- Peters, K.E.; Moldowan, J.M. (1993). *The Biomarker Guide. Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments*. Prentice Hall, New Jersey, Estados Unidos.
- Peters, K. y otros dos autores, (2005). *The Biomarker Guide. Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Price, D.G. (1995). *Weathering and Weathering Processes*, *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology* 28, 243-252.
- Prince, R. C. y otros dos autores, (2002). Weathering of an Arctic oil spill over 20 years: the BIOS experiment revisited. *Marine Pollution Bulletin* 44 (11), 1236–1242.
- Reyes, C.Y. y otros siete autores, (2014). *Weathering of petroleum biomarkers: review in tropical marine environment impacts*, *Open Access Library Journal* 1, 1004.
- Ron, E.Z.; Rosenberg, E. (2014). *Enhanced Bioremediation of Oil Spills in the Sea*, *Current Opinion in Biotechnology* 27, 191-194.
- Stashenko, E. y otros dos autores, (2014). *Extracción selectiva y detección específica de biomarcadores saturados del petróleo*, *Scientia Chromatographica* 6 (4), 251 -268.
- Stout, S. (2009). *Identifying the source of mystery waterborne oil spills — a case for quantitative chemical fingerprinting*, *Environmental Claims Journal*, 17, 71–88.
- Tomas, G.J. y otros dos autores, (2020). *Evaluación geoquímica por biomarcadores del yacimiento Del Mosquito de la Cuenca Austral de la Patagonia Argentina*, *Revista de la Sociedad Geológica de España* 33 (2), 31-40.
- Wang, Z.D. y otros dos autores, (2000). *Characterization and source identification of an unknown spilled oil using fingerprinting techniques by GC-MS and GC-FID*, *LC-GC North America* 10 (18), 1058-1067.
- Wang, Z.D. y otros dos autores, (2006). *Forensic fingerprinting of biomarkers for oil spill characterization and source identification*, *Environmental Forensics* 7, 105–146.
- Wang, Z.; Stout, S.A. (2007). *Oil Spill Environmental Forensics*, 1ª ed. Fingerprint and Source Identification. Academic Press, Waltham, Reino Unido.
- Wang, Z.D. y otros cinco autores, (2007). *Petroleum Biomarker Fingerprinting for Oil Spill Characterization and Source Identification*, *Oil Spill Environmental Forensics* 3, 73-146.
- Yim, U.H. y otros ocho autores, (2011). *Fingerprint and weathering characteristics of stranded oils after the Hebei Spirit oil spill*, *Journal of Hazardous Materials* 197, 60 – 69.
- Zhang, H. y otros cuatro autores, (2015). *Weathering Characteristics of Crude Oils from Dalian Oil Spill Accident, China*, *Aquatic Procedia* 3, 238-244.