

ESTUDIO DE BIOMARCADORES DEL PETRÓLEO A PARTIR DE LA METEORIZACIÓN DE UN CRUDO EN AGUA DE MAR

Study of petroleum biomarkers from the weathering of a crude oil in seawater

Germán Javier TOMAS^{1,2*} y Adrián Javier ACUÑA²

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

² Universidad Tecnológica Nacional. Av. de los Inmigrantes 555, Río Gallegos (9400), Santa Cruz - Argentina.

*Autor para correspondencia: germanjaviertomas@frsc.utn.edu.ar

(Recibido: abril de 2022; aceptado: septiembre de 2022)

Palabras clave: pristano, fitano, terpanos, esteranos.

RESUMEN

Cuando se produce un derrame de crudo sobre sistemas acuáticos tienen lugar diferentes procesos de meteorización sobre este recurso que modifican su composición. Como resultado de estas transformaciones se dificulta la asignación de responsabilidades respecto a las contaminaciones producidas con los hidrocarburos. Sin embargo, en el crudo existen unas moléculas conocidas como biomarcadores con 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 este recurso cuando es expuesto al ambiente. En el presente trabajo se analizó la estabilidad de los biomarcadores para un crudo vertido en agua de mar en condiciones de laboratorio por el período de un año, con el objetivo de probar su utilidad en litigios vinculados a derrames y hurtos de hidrocarburos. Para tal fin, se analizaron los perfiles de biomarcadores por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas a partir de las fracciones del crudo. Además, se calcularon parámetros específicos tales como P/n-C₁₇ (pristano/heptadecano), 4-MeDBT/1-MeDBT (metildibenzotiofenos) y estigmastano C₂₉aS/hopano C₃₀ conocidos como relaciones de diagnóstico que se modificaron en torno a valores menores del 5 % respecto de su desviación estándar relativa en el transcurso de un año. Cabe destacar que las relaciones P/F, (n-C₁₃ + n-C₁₄)/(n-C₂₅ + n-C₂₆) y (N₀ + N₁)/N₂ (N = naftalenos) fueron las únicas con porcentajes por encima del 5 % y estos resultados se asociaron a un proceso de evaporación sobre el crudo. Por otro lado, el análisis de los cromatogramas obtenidos indicó que la biodegradación también estuvo implicada en la meteorización de los hidrocarburos. 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 potencialidad para resolver los problemas antes mencionados.

Key words: pristane, phytane, terpanes, steranes.

ABSTRACT

When an oil spill occurs in aquatic systems, different weathering processes take place on this resource that modify its composition. As a result, it is difficult to assign responsibility for pollution caused by this resource. However, in crude oil there are molecules known as biomarkers with the potential to resist weathering processes depending on the exposure time, alteration kinetics and alteration phenomena that this resource undergoes when exposed to the environment. In the present work, the stability of biomarkers was analyzed for a crude oil spilled in seawater under laboratory conditions for a period of one year, with the objective of testing their usefulness in litigation related to oil spills and/or oil theft. To this end, biomarker profiles were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry from the crude fractions. Specific parameters such as Pr/n-C₁₇ (pristane/heptadecane), 4-MeDBT/1-MeDBT (methylidibenzothiofene) y stigmastane C₂₉αS/hopane C₃₀ known as diagnostic ratios changed around values less than 5 % with respect to their relative standard deviation over the course of one year. Notably, the Pr/Ph ratios, (n-C₁₃ + n-C₁₄)/(n-C₂₅ + n-C₂₆) and (N₀ + N₁)/N₂ (N = naphthalenes) were the only ones with percentages above 5 % and these results were associated with an evaporation process on the crude oil. On the other hand, the analysis of the chromatograms obtained indicated that biodegradation was also involved in the weathering of hydrocarbons. However, most of the biomarkers remained unaltered under the test conditions throughout the study time, which demonstrates their potential to solve the problems mentioned above.

INTRODUCCIÓN

Más de un millón de toneladas de crudo (fase líquida del petróleo) entran en el medio marino anualmente, asociadas a vertidos accidentales o intencionales, filtraciones naturales y producto de actividades tales como la extracción, transporte y almacenamiento de este recurso (Radović et al. 2014). Aunque el número de accidentes catastróficos ha disminuído significativamente durante las últimas décadas, el hundimiento del petrolero Prestige cerca de la costa de Galicia (España) y la ruptura de la plataforma Deepwater Horizon en el Golfo de México, siguen suponiendo una importante amenaza para los ecosistemas marinos y costeros, causando grandes daños al ambiente (White et al. 2012). Además, surgen nuevas preocupaciones ambientales a medida que la industria petrolera se aventura a recuperar petróleo en regiones más hostiles, difíciles y peligrosas como las aguas ultraprofundas, el Ártico y a lo largo de las fronteras nacionales que carecen de la infraestructura necesaria para responder eficazmente a cualquier percance (Radović et al. 2014). Una vez en el mar, los hidrocarburos derramados experimentan a una serie de procesos físicos, químicos y biológicos conocidos como meteorización, que involucran fenómenos tales como evaporación, disolución, degradación microbiana y fotooxidación, que alteran la composición original de los mismos (Flores et al. 2020).

Identificar el origen de los derrames de crudo, ya sean agudos o crónicos, es el primer paso para evaluar sus consecuencias y definir mejor las estrategias de respuesta. Los métodos analíticos eficientes e inequívocos para la caracterización de estos vertidos también son necesarios desde el punto de vista de la aplicación de las leyes de control de la contaminación, que tienen por objeto proteger la salud pública y el ambiente (Kienhuis et al. 2019). La metodología más madura para resolver estas problemáticas se basa en el enfoque de la huella química, es decir, una serie de hidrocarburos son determinados mediante cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama (GC/FID) o acoplado a un espectrómetro de masas (GC/MS; Wang et al. 2007). Las distribuciones y proporciones características de los compuestos seleccionados generan un patrón molecular que puede utilizarse para identificar la fuente del crudo diseminado. Este procedimiento se ha utilizado ampliamente (Wang y Fingas 2003) y recientemente fue estandarizado (Kienhuis et al. 2019). Para mejorar la fiabilidad de la evaluación de las diferencias entre los perfiles de las muestras del vertido y de la fuente sospechosa de origen, se calculan una serie de relaciones de diagnóstico (RD) a partir de estos compuestos que han sido seleccionados por su diversidad y/o respuesta a los procesos de meteorización (Hansen et al. 2007). Para que el método sea independiente de la experiencia del analista y más robusto que la comparación visual cualitativa de los cromatogramas, se cotejan las RD.

En este sentido, es importante conocer el efecto de los procesos de meteorización sobre estas relaciones para una adecuada interpretación de los resultados en casos reales (Olson et al. 2017).

La estructura compleja y variada del crudo da lugar a una composición heterogénea formada por miles de moléculas de diferente naturaleza. Entre todas ellas existe un grupo que se caracteriza por una elevada estabilidad cuando el crudo se expone al ambiente (García et al. 2019). Estos compuestos, conocidos como biomarcadores, han sido ampliamente utilizados para la identificación de derrames de hidrocarburos en alta mar (Bayona et al. 2015). Una gran cantidad de RD derivadas de los biomarcadores basados en el análisis GC/MS, se han identificado para diferenciar crudos en todo el mundo (Chandru et al. 2008). La evaluación y el seguimiento de los procesos de meteorización asociados a los biomarcadores son importantes herramientas para la geoquímica del petróleo, ya que esto permite predecir, con relativa certeza, el tiempo de permanencia y qué tipo de sustancias se generan durante estos siniestros (Reyes et al. 2014). El objetivo del presente trabajo fue demostrar la estabilidad de los biomarcadores a partir de un crudo sometido a un proceso de meteorización en reactores abiertos con agua de mar 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 de gases acoplada a la espectrometría de masas, para aplicarlos como herramientas de validez en litigios por hurtos o derrames de hidrocarburos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de crudo sometida a meteorización en agua de mar

El crudo fue recolectado en el yacimiento Del Mosquito (51°51'51" S, 68°57'7" W) perteneciente a la Cuenca Austral (Formación Springhill), provincia de Santa Cruz, Argentina. El mismo se caracterizó por tener una gravedad API de 32° a 15 °C (crudo liviano) y una salinidad de 52 g/m³. 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 hidrocarburo y, además, prevenir su biodegradación. Luego fue almacenado en un lugar oscuro y seco a temperatura ambiente hasta la realización de la experiencia dentro de las siguientes 72 h (Tomas et al. 2020).

Ensayo de meteorización en agua de mar

El estudio de meteorización del crudo en agua de mar 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 100 mL de agua de mar proveniente de Punta Loyola (51°36'25" S, 69°01'08" W) 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 fenómenos tales como la fotooxidación, evaporación y biodegradación modificaran 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.

Obtención del crudo meteorizado

Cumplido los intervalos de tiempo de cada etapa, se procedió a extraer el crudo agregado a los reactores mediante la adición en cada uno de ellos de 10 mL de n-pentano. Posteriormente se obtuvo la fase orgánica con la utilización de una ampolla de decantación de 200 mL, la que se recuperó y se transfirió a un vial. El volumen contenido en los viales se dividió en dos, una parte se guardó refrigerada y la otra se sometió 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), al que se le adicionó 50 mg de sulfato de sodio activado y 50 mg de alúmina activada en su parte superior. Para esta separación se sembraron aproximadamente 100 µL de crudo en la columna y luego se eluyeron con 10 mL de n-pentano y 10 mL de diclorometano, para obtener las fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos respectivamente. Los extractos obtenidos se concentraron hasta 0.5 mL bajo corriente de nitrógeno, se transfirieron a un vial de cromatografía, y se almacenaron a -15 °C hasta su análisis (TNRCC 2000).

Identificación de n-alcenos, isoprenoides e hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) se llevó a

cabo teniendo en cuenta las publicaciones de Tomas y Acuña (2022) y Stashenko et al. (2014). Por cada muestra se inyectó en un cromatógrafo de gases, 1 μL de una dilución 1:100 en pentano del crudo guardado sin separar en modo fraccionado (split) y 1 μL de los extractos alifáticos y aromáticos en modo sin fraccionamiento (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. El programa de temperatura utilizado fue el siguiente: temperatura inicial de 55 °C durante 2 min, seguido de una rampa de 6 °C/min hasta alcanzar los 270 °C, pasando directamente a otra rampa de 3 °C/min 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 unidades de masa atómica (uma) se realizó para obtener el cromatograma de iones totales (TIC, por sus siglas en inglés) con el fin de determinar la

distribución de n-alcenos, pristano y fitano. Por su parte, el monitoreo de iones seleccionados (modo SIM Scan) se utilizó para analizar los iones $m/z = 128$ (naftaleno), 142 (metilnaftaleno), 156 (dimetilnaftaleno), 170 (trimetilnaftaleno), 178 (fenantreno), 184 (tetrametilnaftaleno y dibenzotiofeno), 192 (metilfenantrenos), 198 (metildibenzotiofenos) en la fracción aromática, y los iones $m/z = 191$ (terpanos) y 217 (esteranos), en el extracto alifático (**Cuadro I**). De esta manera se obtuvieron los fragmentogramas de interés correspondientes a cada muestra, haciendo uso del programa de computadora 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.

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. La selección de las RD se llevó a cabo a partir de la literatura publicada por Fernández-Varela et al. (2010) y se calcularon 12 RD (**Cuadro II**) derivadas de hopanos y esteranos comúnmente utilizadas para la identificación de fuentes de contaminación

CUADRO I. COMPUESTOS ANALIZADOS Y SUS RELACIONES DE MASA/CARGA (m/z).

TIC	$m/z = 191$	$m/z = 128$	$m/z = 178$
n-C ₉	Terpano tricíclico C ₂₃	Naftaleno	Fenantreno
n-C ₁₀	Terpano tricíclico C ₂₆	$m/z = 142$	$m/z = 184$
n-C ₁₁	Trisnorhopano C ₂₇ (Ts)	2-Metilnaftaleno	1,3,5,7 - Tetrametilnaftaleno
n-C ₁₂	Trisnorneohopano C ₂₈ (Tm)	1-Metilnaftaleno	1,3,6,7 - Tetrametilnaftaleno
n-C ₁₃	Hopano C ₂₉ (H ₂₉)	$m/z = 156$	1,2,4,6 - Tetrametilnaftaleno
n-C ₁₄	Hopano C ₃₀ (H ₃₀)	2-Etilnaftaleno	1,2,4,6 - Tetrametilnaftaleno
n-C ₁₅	Hopano C ₃₁ (H ₃₁) (S y R)	1-Etilnaftaleno	1,2,4,7 - Tetrametilnaftaleno
n-C ₁₆	Hopano C ₃₂ (H ₃₂) (S y R)	2,6 + 2,7 - Dimetilnaftaleno	1,4,6,7 - Tetrametilnaftaleno
n-C ₁₇	Hopano C ₃₃ (H ₃₃) (S y R)	1,3 + 1,7 - Dimetilnaftaleno	2,3,6,7 - Tetrametilnaftaleno
P	$m/z = 217$	1,6 - Dimetilnaftaleno	1,2,6,7 - Tetrametilnaftaleno
n-C ₁₈	Esterano C ₂₀	1,4 + 2,3 - Dimetilnaftaleno	1,2,3,7 - Tetrametilnaftaleno
F	Pregnano C ₂₁	1,5 - Dimetilnaftaleno	1,2,3,6 - Tetrametilnaftaleno
n-C ₁₉	Homopregnano C ₂₂	1,2 - Dimetilnaftaleno	1,2,5,6 - Tetrametilnaftaleno
n-C ₂₀	Diasteranos C ₂₇	$m/z = 170$	Dibenzotiofeno (DBT)
n-C ₂₁	Colestanos C ₂₇	1,3,7 - Trimetilnaftaleno	$m/z = 192$
n-C ₂₂	Ergostanos C ₂₈	1,3,6 - Trimetilnaftaleno	3 - Metilfenantreno
n-C ₂₃	Estigmastanos C ₂₉	1,3,5 - Trimetilnaftaleno	2 - Metilfenantreno
n-C ₂₄	-	2,3,6 - Trimetilnaftaleno	9 - Metilfenantreno
n-C ₂₅	-	1,2,7 - Trimetilnaftaleno	1 - Metilfenantreno
n-C ₂₆	-	1,2,6 - Trimetilnaftaleno	$m/z = 198$
n-C ₂₇	-	1,2,4 - Trimetilnaftaleno	4 - Metildibenzotiofeno
n-C ₂₈	-	1,2,5 - Trimetilnaftaleno	2 - Metildibenzotiofeno
n-C ₂₉	-	1,4,6 - Trimetilnaftaleno	3 - Metildibenzotiofeno
n-C ₃₀	-	1,6,7 - Trimetilnaftaleno	1 - Metildibenzotiofeno

CUADRO II. DESVIACIONES ESTÁNDAR RELATIVAS (DER) DE LAS RELACIONES DE DIAGNÓSTICO (RD) PARA LAS MUESTRAS DE CRUDO SOMETIDAS A METEORIZACIÓN EN AGUA DE MAR CONSIDERANDO LOS DIEZ TIEMPOS DEFINIDOS PARA EL ENSAYO.

RDs	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	DER
P / F	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.0	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.0	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.1 ± 0.0	14.3 %
P / n-C ₁₇	0.41 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.43 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.43 ± 0.04	0.43 ± 0.01	0.44 ± 0.02	3.26 %
F / n-C ₁₈	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.00	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.00	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.01	3.97 %
(n-C ₁₃ + n-C ₁₄) / (n-C ₂₅ + n-C ₂₆)	1.39 ± 0.02	1.29 ± 0.07	1.29 ± 0.03	1.25 ± 0.07	1.13 ± 0.08	0.15 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	99.9 %
(N ₀ + N ₁) / N ₂	0.54 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	99.9 %
2-MP / 1-MP	1.54 ± 0.04	1.62 ± 0.06	1.54 ± 0.07	1.52 ± 0.02	1.53 ± 0.02	1.51 ± 0.09	1.50 ± 0.04	1.47 ± 0.01	1.46 ± 0.00	1.46 ± 0.03	3.11 %
4-MeDBT / 1-MeDBT	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.3	6.0 ± 0.1	6.1 ± 0.4	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.2	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.1	0.47 %
2 + 3-MeDBT / 1-MeDBT	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.2	1.30 %
T _S / H ₃₀	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.01	3.01 %
G ₃₀ / H ₃₀	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	4.46 %
M ₃₀ / H ₃₀	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	2.75 %
T _S / T _m	0.49 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.49 ± 0.00	0.50 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.01	0.52 ± 0.02	1.97 %
M ₃₀ / H ₂₉	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.16 ± 0.00	4.10 %
Homohopano C ₃₁ R / Homohopano C ₃₁ S	0.57 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.57 ± 0.02	0.55 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.57 ± 0.01	2.35 %
Diasterano C ₂₇ βR / Hopano C ₃₀	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	4.20 %
Diasterano C ₂₇ βS / Diasterano C ₂₇ βR	2.34 ± 0.03	2.35 ± 0.08	2.33 ± 0.00	2.32 ± 0.00	2.36 ± 0.04	2.32 ± 0.14	2.34 ± 0.04	2.30 ± 0.04	2.35 ± 0.08	2.32 ± 0.05	0.75 %
Estigmastanos C ₂₈ α(R + S) / Hopano C ₃₀	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	4.55 %
Diasterano C ₂₇ βR / Estigmastano C ₂₉ αS	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.22 ± 0.00	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.00	0.26 ± 0.01	4.63 %
Estigmastano C ₂₉ αS / Hopano C ₃₀	0.14 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.00	4.50 %
Estigmastanos C ₂₉ αS / Estigmastanos C ₂₉ α(R + S)	2.30 ± 0.10	2.28 ± 0.18	2.30 ± 0.06	2.21 ± 0.06	2.24 ± 0.10	2.24 ± 0.13	2.26 ± 0.19	2.24 ± 0.10	2.23 ± 0.07	2.20 ± 0.10	1.46 %

DER = (DE(T0-T9)/PROMEDIO(T0-T9))*100 Fórmula aplicada en Excel Microsoft Office DER = Desviación estándar relativa DE = Desviación estándar

P/F = pristano/fitano; P/n-C₁₇ = pristano/heptadecano; F/n-C₁₈ = fitano/octadecano; (n-C₁₃ + n-C₁₄)/(n-C₂₅ + n-C₂₆) = (tridecano + tetradecano)/(pentadecano + hexadecano); (N₀ + N₁)/N₂ = (naftaleno + metilnaftaleno)/dimetilnaftaleno; 2-MP/1-MP = 2-metilfenantreno/1-metilfenantreno; 4-MeDBT/1-MeDBT = 4-metildibenzotiofeno/1-metildibenzotiofeno; 2 + 3-MeDBT/1-MeDBT = 2 + 3-metildibenzotiofenos/1-metildibenzotiofeno; T_S/H₃₀ = trisnorhopano/hopano C₃₀; G₃₀/H₃₀ = gammacerano/hopano C₃₀; M₃₀/H₃₀ = moretano/hopano C₃₀; T_S/T_m = trisnorhopano/trisnormeohopano; M₃₀/H₂₉ = moretano/hopano.

por hidrocarburos para evaluar qué tan recalcitrantes son a la meteorización. Además, con base en trabajos de Wang et al. (2000) y Lemkau et al. (2010) se consideraron otros índices de diagnóstico generados a partir de n-alcenos, pristano, fitano e HAP (**Cuadro II**). 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 RD en función del tiempo de estudio a través de sus DER 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). El cálculo de los parámetros estadísticos se llevó a cabo mediante el programa Excel Microsoft Office.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cromatogramas de iones totales (TIC)

Visualizar los TIC constituye el punto de partida para determinar si existieron modificaciones en la composición de las muestras de crudo bajo las condiciones de laboratorio a las que fueron sometidas (**Fig. 1**). En el tiempo cero (T0) se observó una distribución bimodal de los n-alcenos, desde el nonano (n-C₉) hasta el triacotano (n-C₃₀; **Fig. 1A**). Entre la primera (T1) y la segunda (T2) semana comenzó a manifestarse una disminución en los n-alcenos más livianos caracterizada por una reducción total del n-C₉ (**Fig. 1B-C**) y, por otro lado, se produjo un levantamiento de la línea de base, lo cual corresponde a moléculas generadas por biodegradación que no pueden ser resueltas bajo las condiciones de MCNR (mezcla de compuestos no resueltos, Peters et al. 2005). Durante la tercera semana (T3) y el primer mes (T4) se hizo más marcado el aumento de la línea de base (**Fig. 1D-E**) y la distribución de n-alcenos se caracterizó por una disminución de la abundancia de los compuestos n-C₁₀, n-C₁₁, n-C₁₂ y n-C₁₃. Los cambios observados pueden explicarse a través de un efecto sinérgico entre la volatilización de los n-alcenos livianos y una biodegradación incipiente del crudo. Muestras de un crudo sometidas a meteorización por un período de 30 días en el laboratorio (Olson et al. 2017) utilizando agua de mar artificial (esterilizada) con el agregado de nutrientes y sin/con la presencia de un dispersante químico experimentaron una evaporación de sus n-alcenos livianos (n-C₁₀ a n-C₁₃). Sin embargo, el mismo crudo bajo las mismas condiciones, pero expuesto a agua de mar, presentó como primer compuesto de su perfil de n-alcenos al n-C₁₇ sugiriendo a la biodegradación como proceso

dominante (Olson et al. 2017). A los dos meses (T5) no se observaron los picos correspondientes a los n-alcenos C₁₀, C₁₁, C₁₂ y C₁₃. Este comportamiento se vio reflejado en los resultados cuantitativos provenientes de simulaciones controladas en laboratorio de un hidrocarburo expuesto a agua de mar, que produjo disminuciones relativas de las moléculas alifáticas de menor peso molecular (n-C₁₁ a n-C₁₅), pero en las cuales no se observaron descensos significativos después de 15 semanas para n-alcenos > n-C₁₅ (Agüero-Manzano 2019). Además, en el transcurso de esta etapa (T5) se incrementó la MCNR o joroba en el cromatograma, que es una evidencia típica de biodegradación (**Fig. 1F**). Durante T6, T7 y T8 (cuatro, seis y nueve meses, respectivamente) el crudo evidenció una pérdida de las moléculas n-C₁₄, n-C₁₅ y n-C₁₆, y se hizo más pronunciado aún el levantamiento de la línea de base (**Fig. 1G-I**). Asimismo, es importante considerar que la fracción más liviana de n-alcenos generalmente es la primera en ser degradada por ser la de menor complejidad y de rápida metabolización por los microorganismos (Peters et al. 2005). Cuando la experiencia cumplió un año (T9) se visualizó en el TIC (**Fig. 1J**) una disminución del n-C₁₇ y del P, que derivó en un fuerte descenso de la relación P/F (**Cuadro II**). Estos resultados sugieren que la evaporación y la biodegradación coexisten como fenómenos de alteración de las muestras de crudo sometidas a ensayo. Sin embargo, sobre la MCNR se observan señales de alta intensidad para los n-alcenos entre n-C₁₇ y n-C₃₀, y los isoprenoides acíclicos P y F, lo que indica en principio que estos compuestos no han sido biodegradados.

Fragmentogramas de isoprenoides cíclicos

Los fragmentogramas para los terpanos y esterenos se representan en las **figuras 2 y 3**, respectivamente. Se visualizó un paulatino levantamiento de la línea de base en los fragmentogramas del ion m/z = 191, que no afectó el patrón de distribución presentado por los terpanos (**Fig. 2A-J**), donde se detectaron terpanos tricíclicos (C₂₃ y C₂₆), pentacíclicos (hopanos C₂₉ y C₃₀) y los hopanos extendidos (homohopanos C₃₁, C₃₂ y C₃₃). Cabe destacar que no se observó un decrecimiento en la señal vinculada a los homohopanos (C₃₁ a C₃₃) ni en las concentraciones relativas del resto de isoprenoides cíclicos (**Fig. 2B-J**). En los yacimientos petrolíferos la biodegradación de estos biomarcadores tiene lugar por la pérdida de un grupo metilo, originándose los 25-norhopanos u hopanos desmetilados (Peters et al. 2005), que pueden identificarse a través del fragmentograma de masas m/z = 177. Para las muestras de este estudio estos

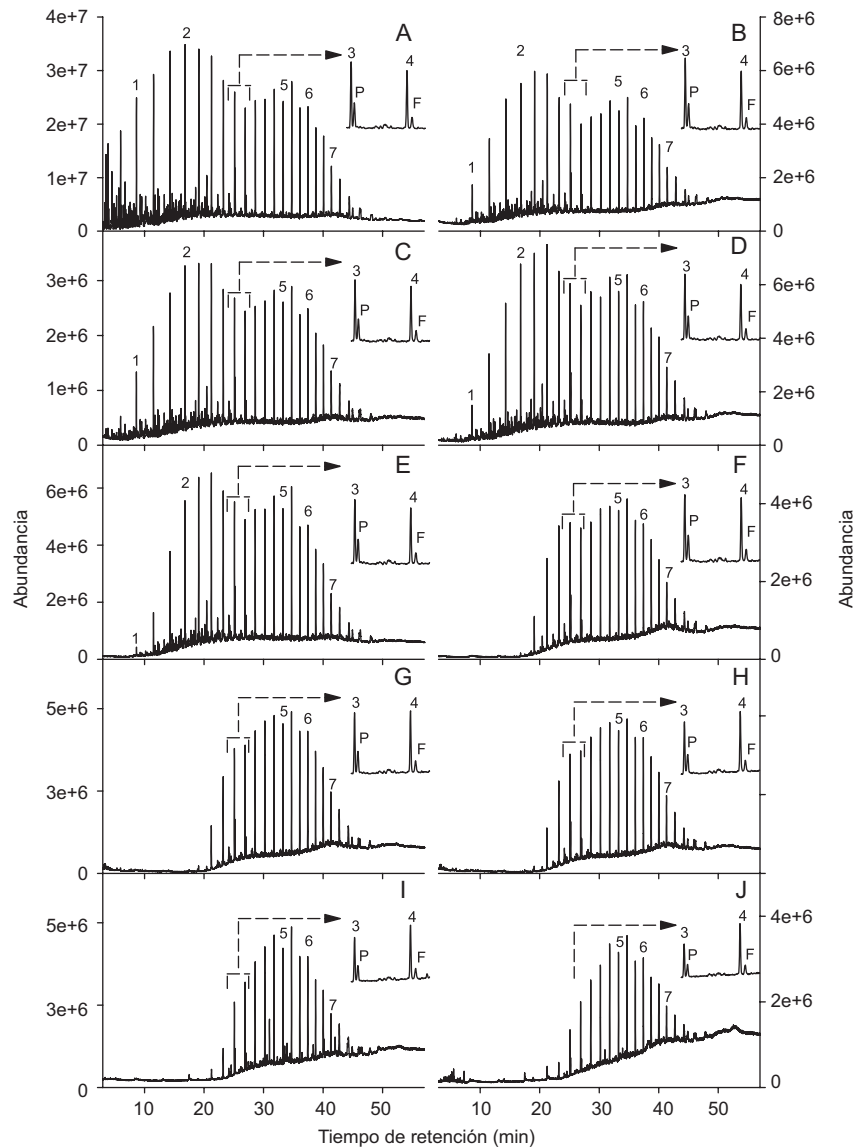


Fig. 1. Cromatogramas de iones totales para los crudos extraídos de agua de mar a los tiempos T0 (A), T1 (B), T2 (C), T3 (D), T4 (E), T5 (F), T6 (G), T7 (H), T8 (I), T9 (J). 1: decano (n-C₁₀), 2: tridecano (n-C₁₃), 3: heptadecano (n-C₁₇), 4: octadecano (n-C₁₈), 5: docosano (n-C₂₂), 6: pentacosano (n-C₂₅), 7: octacosano (n-C₂₈), P: pristano, F: fitano.

compuestos no fueron observados, lo que refuerza los resultados obtenidos para los homohopanos (datos no presentados). Por otra parte, 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 alteró la intensidad relativa del patrón de distribución de los esteranos regulares (C₂₇, C₂₈, C₂₉) en el transcurso de la experiencia (**Fig. 3A-J**).

Los esteranos no presentaron un orden de alteración específico luego de los 365 días de meteorización, sin embargo, la intensidad de las señales entre C₂₁ y C₂₂ con respecto a C₂₇, C₂₈ y C₂₉, sugiere una posible alteración por biodegradación (López e Infante 2021). Por otra parte, ensayos de meteorización sobre crudos llevados a cabo en el laboratorio han demostrado que tanto los terpanos como los esteranos no fueron afectados por el fenómeno de evaporación, ya que estos se concentraron proporcionalmente respecto al

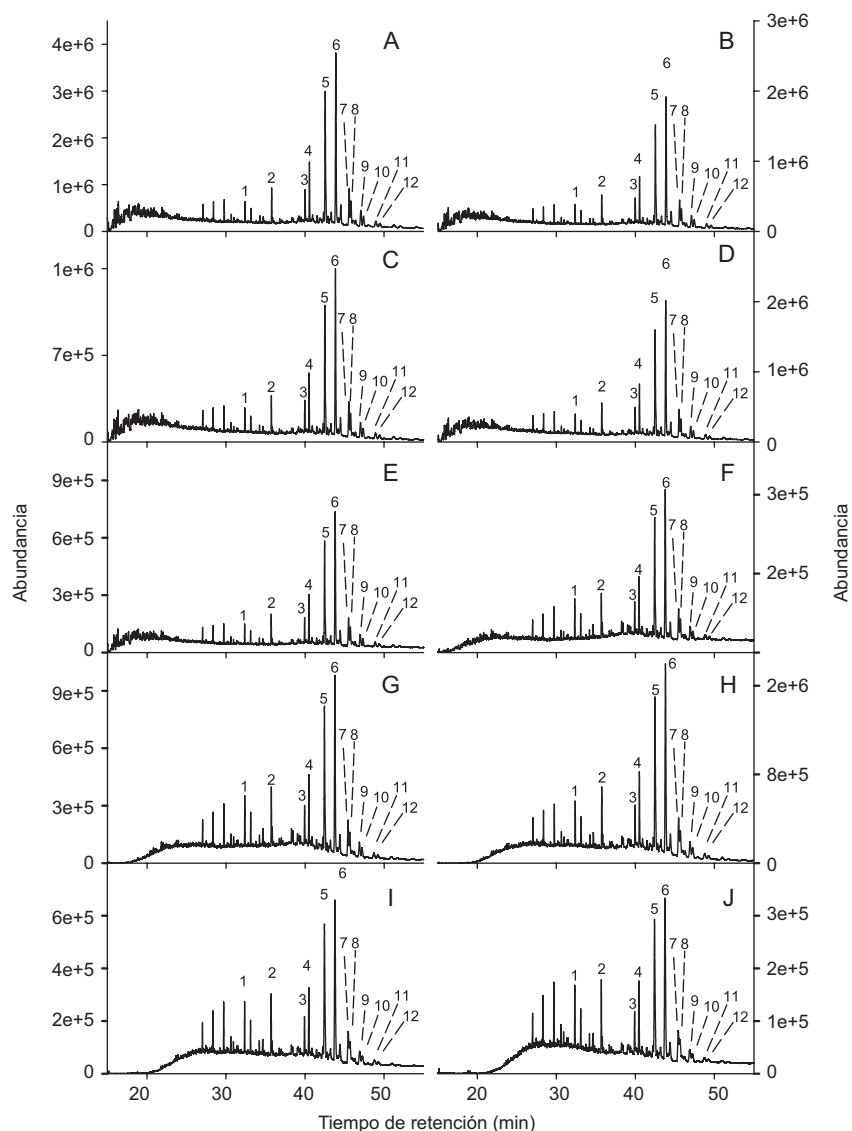


Fig. 2. Fragmentogramas de la relación masa/carga correspondiente al ion 191 para los crudos extraídos de agua de mar a los tiempos T0 (A), T1 (B), T2 (C), T3 (D), T4 (E), T5 (F), T6 (G), T7 (H), T8 (I), T9 (J). 1: terpano tricíclico C₂₃, 2: terpano tricíclico C₂₆, 3: trisnorhopano (Ts), 4: trisnorhopano (Tm), 5: norhopano C₂₉, 6: hopano C₃₀, 7-8: homohopanos C₃₁ (R y S), 9-10: homohopanos C₃₂ (R y S), 11-12: homohopanos C₃₃ (R y S).

aumento de los porcentajes de los crudos degradados (Wang et al. 1995, Wang y Fingas 2003). Estos resultados muestran una relativa estabilidad de estos isoprenoides cíclicos bajo estas condiciones de ensayo. La recalcitrancia a la meteorización de terpanos y esteranos ha sido documentada en numerosas investigaciones, por ejemplo, un estudio de biodegradación llevado a cabo en el laboratorio demostró que no se produjeron señales de alteración en la composición de terpanos y esteranos, independientemente del tipo

de crudo (ligero, medio o pesado), tiempos de incubación (7, 14 y 28 días), condiciones de incubación (4, 10, 15, y 22 °C), y presencia o no de nutrientes (Swannel et al. 1996, Wang et al. 1998). Otros estudios asociados a vertidos de crudo ligeros en agua de mar que fue enriquecida con nutrientes expusieron la pronunciada estabilidad del hopano H₃₀ frente a fenómenos tales como la biodegradación por periodos de seis meses a una temperatura media de 15 °C en el laboratorio (Prince et al. 1994) y 14 semanas en

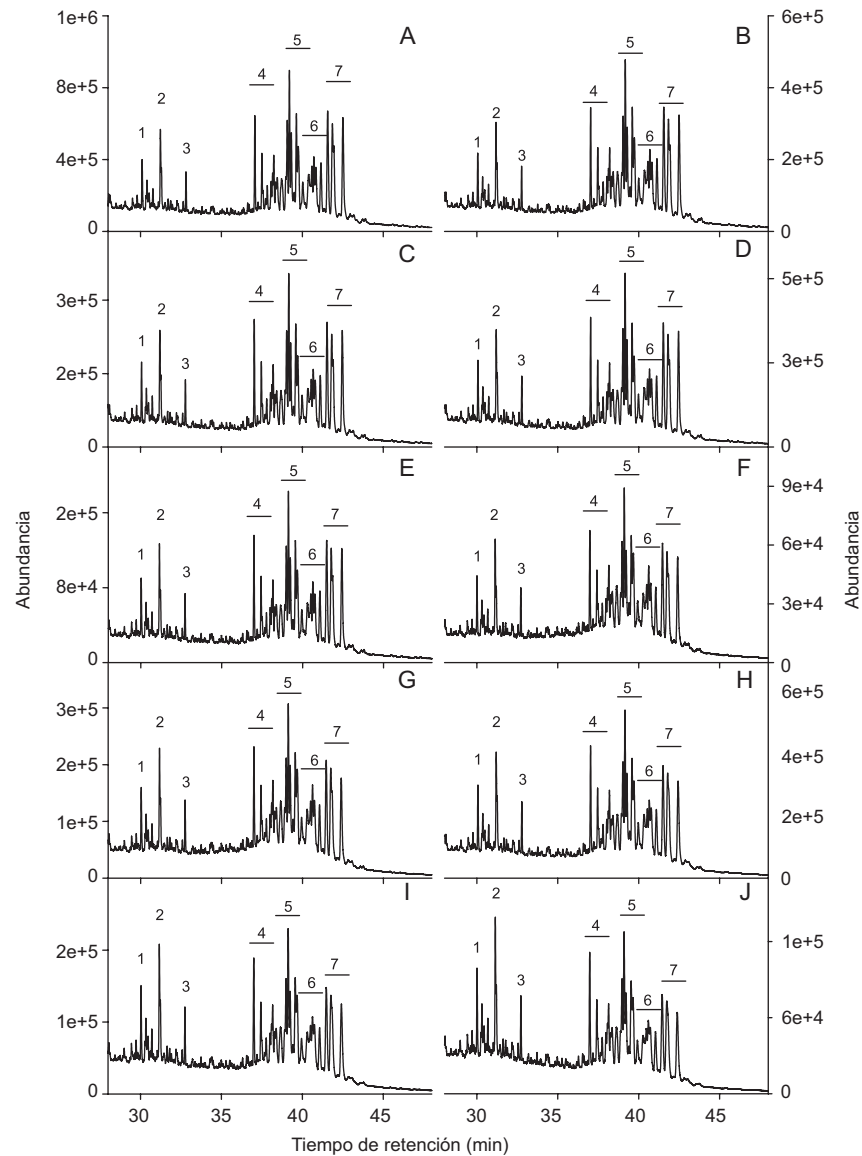


Fig. 3. Fragmentogramas de la relación masa/carga correspondiente al ion 217 para los crudos extraídos de agua de mar a los tiempos T0 (A), T1 (B), T2 (C), T3 (D), T4 (E), T5 (F), T6 (G), T7 (H), T8 (I), T9 (J). 1: esterano C₂₀, 2: pregnano C₂₁, 3: homopregnano C₂₂, 4: diasteranos C₂₇, 5: colestanos C₂₇, 6: ergostanos C₂₈, 7: estigmastanos C₂₉.

parcelas construidas en la playa (Venosa et al. 1997) o a la fotooxidación cuando fueron expuestos a radiación UV por 48 horas a una distancia de 15 cm en el laboratorio (Garrett et al. 1998). 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). Además, se ha observado en varios estudios de campo a largo plazo. Por ejemplo, ocho años después de un experimento de vertido de petróleo en un manglar de Guadalupe (Antillas Menores), los

esteranos y hopanos totales se redujeron en más de un 25 % (Munoz et al. 1997). Se hicieron observaciones similares 20 años después a partir de un derrame de petróleo en el Ártico (Prince et al. 2002).

Relaciones de diagnóstico de n-alcenos e isoprenoides

Las RD presentadas en el **cuadro II** tuvieron valores de DER inferiores al 5 % en la mayoría de los casos, por lo tanto, se considera que estas relaciones no han sido afectadas por las condiciones del

ensayo. A partir de las áreas se calcularon las relaciones $P/n-C_{17}$ y $F/n-C_{18}$ para ser utilizadas como índices de biodegradación, ya que comparan compuestos con diferentes grados de resistencia. En este sentido, el pristano y el fitano son resistentes a la biodegradación respecto a $n-C_{17}$, y $n-C_{18}$ (Peters et al. 2005). Estas relaciones $P/n-C_{17}$ y $F/n-C_{18}$ no sobrepasaron el 3 % de la DER lo que indica que no se ha producido el agotamiento preferencial de los hidrocarburos fácilmente degradables ($n-C_{17}$ y $n-C_{18}$) frente a los isoprenoides acíclicos P y F, lo que también se ha observado en otros estudios como los presentados por Yim et al. (2011) y Zhang et al. (2015). Por otro lado, si la evaporación ha sido el fenómeno de meteorización predominante durante el ensayo, explica mejor que los valores de $P/n-C_{17}$ y $F/n-C_{18}$ permanecieran relativamente constantes debido a que los compuestos $n-C_{17}$, $n-C_{18}$, P y F tienen presiones de vapor semejantes y pasan al estado gaseoso con la misma tendencia (Turner et al. 2014). Con respecto a los cocientes P/F y $(n-C_{13} + n-C_{14})/(n-C_{25} + n-C_{26})$, los mismos exhibieron valores de DER superiores al 5 % (**Cuadro II**). Esto puede interpretarse a partir de las menores masas moleculares del F, $n-C_{13}$ y $n-C_{14}$, y por ende sus mayores tasas de evaporación respecto al P, $n-C_{25}$ y $n-C_{26}$, respectivamente, que generaron una disminución de sus RD afectando a su vez sus valores de DER.

Las RD determinadas para los terpanos y esteranos (**Cuadro II**) se situaron por debajo del 5 % de la DER en todos los casos, por lo cual se sugiere que las mismas no han sido afectadas por la evaporación y la biodegradación incipiente que han tenido lugar durante el año de ensayo. Respecto a la primera, cuando la evaporación de un crudo tiene lugar, los compuestos de elevada masa molecular, como estos biomarcadores, tienden a aumentar su concentración en el crudo residual sin modificar sus RD (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 terpanos y esteranos. Finalmente, es importante destacar que la elevada estabilidad de estos isoprenoides cíclicos fue documentada en investigaciones asociadas a contaminaciones ambientales con crudo o simuladas en el laboratorio en intervalos cortos de tiempo (días) o períodos muy largos (varios años). Por ejemplo, las 12 RD presentadas en el **cuadro II** correspondientes a terpanos y esteranos también fueron monitoreadas por Zhang et al. (2015) en otro estudio y luego de tres meses de seguimiento ninguna superó el 5 % de su DER. Finalmente, no se

observó ningún cambio en la relación Ts/Tm luego de 24 años de producido un derrame en el Estrecho de Magallanes (Wang et al. 2001).

Relaciones de diagnóstico e histogramas de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Como compuestos relativamente estables, los HAP se han utilizado para determinar el origen y destino ambiental del crudo y sus derivados. No se pueden considerar biomarcadores debido a que sus precursores no están definidos, no obstante, son herramientas invaluable dentro de la geoquímica orgánica (Sivan et al. 2008). Una de las RD derivadas de los HAP es $(N_0 + N_1)/N_2$ que relaciona las concentraciones entre el naftaleno y sus metilderivados. Desde el inicio del ensayo hasta los dos meses posteriores (T5) sus valores fueron decreciendo hasta cero (**Cuadro II**), por lo tanto, el naftaleno y los metilnaftalenos se evaporaron a una mayor velocidad que los dimetilnaftalenos. Este cambio tan marcado no se produjo en el resto de las RD asociadas a los HAP. El cociente 2-MP/1-MP (metilfenantrenos) está vinculado con procesos de fotooxidación (Olson et al. 2017), pero la DER de este fue inferior al 5 %. Entonces, considerando que los reactores del ensayo se colocaron durante todo el experimento fuera de la incidencia directa de luz, se puede sugerir que la fotooxidación no ha alterado la composición de los HAP en esta simulación. Otras RD importantes en este tipo de investigación provienen de los metilderivados del dibenzotiofeno. Se sabe que el 4- y el 2 + 3-MeDBT (metildibenzotiofenos) se biodegradan selectivamente más rápido que el 1-MeDBT y pueden utilizarse como indicadores de biodegradación (Wang y Fingas 1995). Los valores de DER para 4-MeDBT/1-MeDBT y 2 + 3-MeDBT/1-MeDBT próximas al 3 y 4 %, respectivamente, sugieren que aún no han sido afectadas por un proceso de biodegradación considerando el tiempo y las condiciones del ensayo. Sin embargo, estas relaciones superaron el 5 % de sus DER en un estudio de meteorización de crudo llevado a cabo en una playa del mar de China durante 95 días. Esto sugirió que tanto la biodegradación como la fotólisis estaban actuando sobre los hidrocarburos (Zhang et al. 2015).

Los porcentajes relativos de los HAP a lo largo del tiempo definido para el estudio de crudo en agua de mar experimentaron variaciones (**Fig. 4**). Inicialmente en el sistema acuoso T0 (**Fig. 4A**) se observó la presencia de naftaleno (N_0) y sus metilderivados, fenantreno (P_0) y metilfenantrenos (P_1), dibenzotiofeno (D_0) y metildibenzotiofenos (D_1), siendo los compuestos mayoritarios los dimetilnaf-

talenos (N₂) con una abundancia relativa inferior al 0.3 %. Entre T1 y T4 (**Fig. 4B-E**) se produjo una pérdida total del naftaleno y una disminución de los metilnaftalenos (N₁), además, los dimetilnaftalenos (N₂) fueron superados en proporción por los trimetilnaftalenos (N₃). Este agotamiento decreciente con la sustitución de los grupos alquilo se asocia a un proceso de evaporación que se ha observado en otros estudios de dispersiones de crudo en agua de mar llevados a cabo en el laboratorio (Brakstad et al. 2014, Olson et al. 2017) o de accidentes como el caso de la plataforma petrolífera Deepwater Horizon, en las que la evaporación de alcanos e HAP de masa molecular reducida se concluyó como el principal proceso de agotamiento del crudo superficial (Wang et al. 2006). Entre el segundo y cuarto mes (T5 y T6) se evidenció en los histogramas (**Fig. 4F-G**), una disminución de los metil, dimetil y trimetilnaftalenos, y un importante incremento en el porcentaje de los tetrametilnaftalenos (N₄). Además, los metilfenantrenos alcanzaron valores relativos del 0.4 % para convertirse en los HAP dominantes. Es interesante remarcar cómo en otra investigación se determinó que los HAP de baja masa molecular disminuyeron significativamente en muestras de crudo expuestas al agua de mar en el transcurso de 60 y 90 días. Yang et al. (2016) atribuyó este comportamiento a la volatilización de los naftalenos, pero no al resto de los HAP. Luego de seis y nueve meses (T7 y T8) los cromatogramas permitieron observar un descenso de los tri y tetrametilnaftalenos y una marcada estabilidad del fenantreno y de los metilfenantrenos (P₁) como los más abundantes con porcentajes en torno al 0.6 % para este último grupo. Finalmente, luego de un año los tri- y tetrametilnaftalenos disminuyeron considerablemente, el fenantreno permaneció casi invariable y los metilfenantrenos siguieron su tendencia con valores por encima del 0.6 %. Cabe destacar que el dibenzotiofeno (D₀) permaneció prácticamente inalterado a lo largo de los 12 meses con concentraciones relativas mínimas y que los metildibenzotiofenos (D₁) sufrieron un leve incremento en el mismo período.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que durante este ensayo de meteorización de crudo en agua de mar a escala de laboratorio durante el período de un año coexistieron dos procesos que alteraron la composición del crudo. Por un lado, la evaporación promovió una disminución de los n-alcanos livianos, los cambios obser-

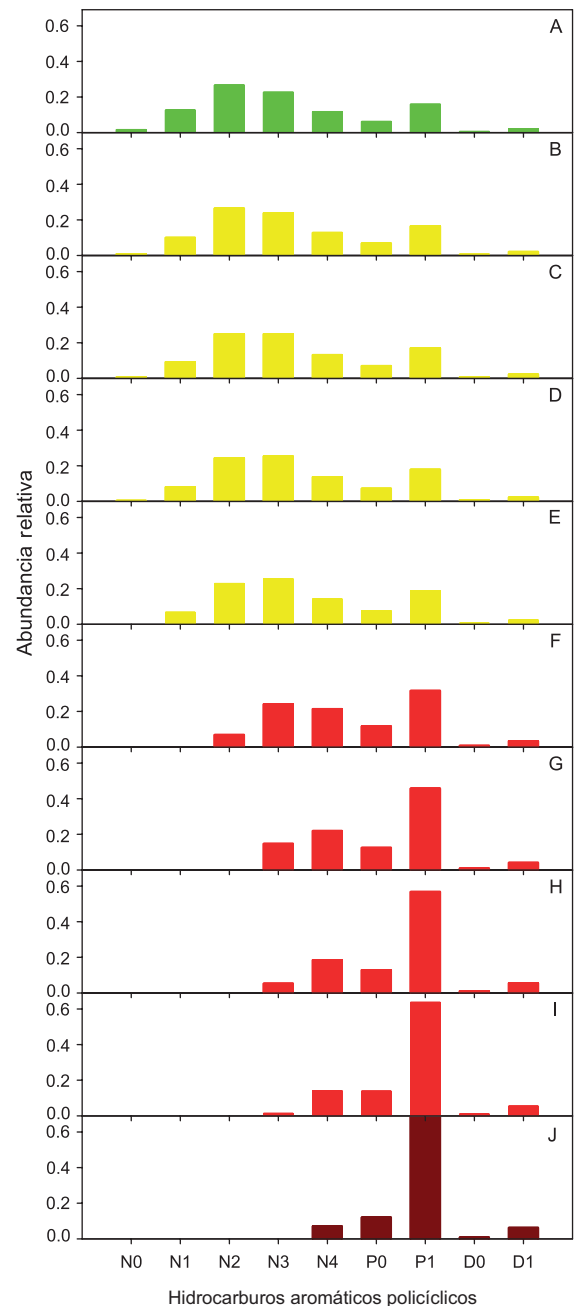


Fig. 4. Histogramas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) para los crudos extraídos de agua de mar a los tiempos T0 (A), T1 (B), T2 (C), T3 (D), T4 (E), T5 (F), T6 (G), T7 (H), T8 (I), T9 (J). N_x: naftaleno y metilderivados, P_x: fenantreno y metilderivados, D_x: dibenzotiofeno y metilderivados.

vados en las RD de los compuestos analizados y la distribución de los HAP en los histogramas a lo largo de la simulación. Por otra parte, una biodegradación incipiente produjo el levantamiento de las líneas de base de los TIC y $m/z = 191$ y 217 . Si consideramos

que estas condiciones en el tiempo de estudio empleado pueden ser extrapoladas a situaciones reales que involucren vertidos de crudo en agua de mar o sustracción, transporte y/o almacenamiento de hidrocarburos robados, entonces el uso potencial de estos biomarcadores es adecuado para resolver los litigios por contaminación y/o hurtos de hidrocarburos ya que constituyen una firma química única y fiable conocida como huella dactilar que identifica a cada crudo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Santa Cruz (proyecto de investigación PI: MSECASC0008395) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar esta investigación. Además, reconocen el invaluable aporte del Ing. Mariano Bertinat, Secretario de Estado de Ambiente de la Provincia de Santa Cruz, por su colaboración y gestión en la obtención del permiso de muestreo del yacimiento del cual se obtuvo el crudo.

REFERENCIAS

- Agüero-Manzano Y. (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, 158 pp.
- Bayona J., Domínguez C. y Albaigés J. (2015). Analytical developments for oil spill fingerprinting. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 5, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2015.01.004>
- Brakstad O., Daling P., Faksness L., Almas I., Vang S., Syslak L. y Leirvik F. (2014). Depletion and biodegradation of hydrocarbons in dispersions and emulsions of the Macondo 252 oil generated in an oil-on-seawater mesocosm flume basin. *Marine Pollution Bulletin* 84 (1-2), 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.05.027>
- Chandru K., Zakaria M., Anita S., Shahbazi A., Sakari M. y Bahry P. (2008). Characterization of alkanes, hopanes, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tar-balls collected from the East Coast of Peninsular Malaysia. *Marine Pollution Bulletin* 56 (5), 950-962. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.01.028>
- Douglas G., Hardenstine J., Liu B. y Uhler A. (2012). Laboratory and field verification of a method to estimate the extent of petroleum biodegradation in soil. *Environmental Science & Technology* 46 (15), 8279-8287. <https://doi.org/10.1021/es203976a>
- Fernández-Varela R., Andrade J., Muniategui S. y 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 (52), 8279-8289. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.043>
- Flores A. y Fuentes P. (2020). La huella digital de búnker para identificación de derrames de combustible. *Ciencia y Tecnología* 36 (2), 1-11.
- García M., Cattani A., da Cunha Lana P., López Figueira R. y Martins C. (2019). Petroleum biomarkers as tracers of low-level chronic oil contamination of coastal environments: A systematic approach in a subtropical mangrove. *Environmental Pollution* 249, 1060-1070. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.006>
- Garrett R., Pickering I., Haith C. y Prince R. (1998). Photooxidation of crude oils. *Environmental Science & Technology* 32 (23), 3719-3723.
- Hansen A., Daling P., Kienhuis P. y Duus R. (2007). Emerging CEN methodology for oil spill identification. En: *Oil spill environmental forensics* (Z. Wang y S. Stout, Eds.). Academic Press, Burlington, EUA, pp. 229-256.
- Kienhuis P., Kraus U. y Kooistra K. (2019). Oil identification. En: *Encyclopedia of Analytical Science* (P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole y M. Miro, Eds.). Academic Press, Oxford, Reino Unido, pp. 45-52.
- Lemkau K., Peacock E., Nelson R., Ventura G., Kovacs J. y Reddy C. (2010). The M/V Cosco Busan spill: Source identification and short-term fate. *Marine Pollution Bulletin* 60 (11), 2123-2129. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.09.001>
- López L. e 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. <https://doi.org/10.20937/RICA.53718>
- Munoz D., Guiliano M., Doumenq P., Jacquot F., Scherrer P. y Mille G. (1997). Long term evolution of petroleum biomarkers in mangrove soil (Guadeloupe). *Marine Pollution Bulletin* 34 (11), 868-874.
- Olson G., Gao H., Meyer B., Miles M. y Overton E. (2017). Effect of Corexit 9500 A on Mississippi Canyon crude oil weathering patterns using artificial and natural seawater. *Heliyon* 3 (3), e00269. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00269>
- Peters K., Walters C. y Moldowan J. (2005). *The biomarker guide: Biomarkers and isotopes in the environment and human history*. 1a ed, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 704 pp.

- Prince R., Elmendorf D., Lute J., Hsu C., Haith C., Senius J., Dechert G., Douglas G. y Butler E. (1994). 17- α (H)-21- β (H)-Hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude oil. *Environmental Science & Technology* 28 (1), 142-145. <https://doi.org/10.1021/es00050a019>
- Prince R., Owens E. y Sergy G. (2002). Weathering of an Arctic oil spill over 20 years: the BIOS experiment revisited. *Marine Pollution Bulletin* 44 (11), 1236-1242.
- Radović J.R., Aeppli C., Nelson R.K., Jiménez N., Reddy C.M., Bayona J.M. y Albaigés J. (2014). Assessment of photochemical processes in marine oil spill fingerprinting. *Marine Pollution Bulletin* 79 (1-2), 268-277. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.11.029>
- Reyes C., Moreira I., Oliveira D., Medeiros N., Almeida M., Wandega F., Soares S. y de Oliveira O. (2014). Weathering of petroleum biomarkers: Review in tropical marine environment impacts. *Open Access Library Journal* 1, e1004. <https://dx.doi.org/10.4236/oalib.1101004>
- Sivan P., Datta G. y Singh R. (2008). Aromatic biomarkers as indicators of source, depositional environment, maturity, and secondary migration in the oils of Cambay Basin, India. *Organic Geochemistry* 39 (11), 1620-1630. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.06.009>
- Song X., Zhang B., Chen B. y Cai Q. (2016). Use of sesquiterpanes, steranes, and terpanes for forensic fingerprinting of chemically dispersed oil. *Water, Air and Soil Pollution* 227 (8), 281.
- Stashenko E., Martínez J. y Robles M. (2014). Extracción selectiva y detección específica de biomarcadores saturados del petróleo. *Scientia Chromatographica* 6, 251-268.
- Swannel R., Lee K. y McDonagh M., (1996). Field evaluation of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews* 60, 342-365.
- TNRCC (2000). TNRCC METHOD 1006. Characterization of Nc6 to Nc35 Petroleum Hydrocarbons in Environmental Samples. Texas Natural Resource Conservation Commission. Método. Texas, EUA, 21 pp.
- Tomas G., Vargas W. y Acuña A. (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.
- Tomas G. y Acuña, A. (2022). Comparaciones basadas en biomarcadores de crudos extraídos de la Formación Springhill (Cuenca Austral) y de la Formación Bajo Barreal (Cuenca Golfo San Jorge), Argentina. *Estudios Geológicos* 78 (1), e143. <https://doi.org/10.3989/egeol.44405.606>
- Turner R., Overton E., Meyer B., Miles M., Turner R., Hooper-Bui L., Engel A., Swenson E., Lee J., Milan C. y Gao H. (2014). Distribution and recovery trajectory of Macondo (Mississippi Canyon 252) oil in Louisiana Coastal Wetlands. *Marine Pollution Bulletin* 87 (1-2), 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.08.011>
- Venosa A., Suidan M., King D. y Wrenn B. (1997). Uso de hopano como biomarcador conservador para controlar la eficacia de la biorremediación del petróleo crudo que contamina una playa de arena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18 (2-3), 131-139.
- Wang Z. y Fingas M. (1995). Differentiation of the source of spilled oil and monitoring of the oil weathering process using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 712, 321-343.
- Wang Z., Fingas M., Blenkinsopp S., Sergy G., Landriault M., Sigouin L., Foght J., Semple K. y Westlake D. (1998). Oil composition changes due to biodegradation and differentiation between these changes to those due to weathering. *Journal of Chromatography A* 809, 89-107.
- Wang Z., Fingas M. y Sigouin L. (2000). Characterization and source identification of an unknown spilled oil using fingerprinting techniques by GC-MS and GC-FID. *Lc-Gc North America* 10, 1058-1067.
- Wang Z., Fingas M., Owens E., Sigouin L. y Brown C. (2001). Long-term fate and persistence of the spilled Metula oil in a marine salt marsh environment - degradation of petroleum biomarkers. *Journal of Chromatography A* 926 (2), 275-290. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01051-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01051-2)
- Wang Z. y Fingas M. (2003). Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin* 47 (9-12), 423-452. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00215-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00215-7)
- Wang Z., Stout S. y Fingas, M. (2006). Forensic fingerprinting of biomarkers for oil spill characterization and source identification. *Environmental Forensics* 7 (2), 105-146. <https://doi.org/10.1080/15275920600667104>
- Wang Z., Yang C., Yang Z., Brown C. (2007). Petroleum biomarker fingerprinting for oil spill characterization and source identification. *Oil Spill Environmental Forensics* 3, 73-146. <https://doi.org/10.1016/B978-012369523-9.50007-0>
- White H., Hsing P., Cho W., Shank T., Cordes E., Quattrini A., Nelson R., Camilli R., Demopoulos A., German C., Brooks J., Roberts H., Shedd W., Reddy C. y Fisher C. (2012). Impact of the Deepwater horizon oil spill on a deep-water coral community in the Gulf of Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (50), 20303-20308. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118029109>

Yang Z., Hollebone B., Brown C., Yang C., Wang Z., Zhang G. y Shah K. (2016). The photolytic behavior of diluted bitumen in simulated seawater by exposed to the natural sunlight. *Fuel* 186, 128-139. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.068>

Yim U., Ha S., An J., Won J., Han G., Hong S., Kim M., Jung J. y Shim W. (2011). Fingerprint and weathering

characteristics of stranded oils after the Hebei Spirit oil spill. *Journal of Hazardous Materials* 197, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.055>

Zhang H., Yin X., Zhou H., Wang J. y Han L. (2015). Weathering characteristics of crude oils from Dalian oil spill accident, China. *Aquatic Procedia* 3, 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.aqpro.2015.02.217>