

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Identificación de compuestos biomarcadores en suelos
contaminados con crudo en Campo Charapas (Sucumbíos-
Ecuador) por cromatografía de gases acoplada a
espectrometría de masas**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en
Ciencias Químicas con Mención en Química Analítica**

DANIELA ALEJANDRA CISNEROS SALAS

Quito, 2022

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica, de la Srta. Daniela Alejandra Cisneros Salas ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M. Sc. Eliza Nuit Jara Negrete

Directora de la Disertación

Quito, 21 de abril de 2022

*A mis padres y hermanos por ser mi inspiración
y un apoyo constante para cumplir mis sueños.
A mi tía Ruth, el ángel que acompaña mis pasos.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios y a la virgen Dolorosa por siempre bendecir e iluminar mi camino.

A mis padres Ricardo y Elizabeth, por su trabajo, sacrificio y amor incondicional; han sido los dos pilares fundamentales en mi formación personal y profesional. Gracias por confiar en mí y dar todo de ustedes para permitirme cumplir mis sueños.

A mis hermanos Cristina y Nicolás, su esfuerzo y dedicación ha sido una total inspiración en mi crecimiento. Agradezco todos los días el cuidado y las enseñanzas que me brindan.

A Joel, quien ha sido el amigo y compañero más importante en este camino, gracias por impulsarme desde el inicio, por creer en mí y no dejar que me dé por vencida.

A Monsita, mi hermana y cómplice de aventuras. Gracias por cuidarme, escucharme y animarme a cumplir mis sueños. Eres el ejemplo más grande de amistad sincera.

A mis maestras, M. Sc. Eliza Jara, Dr. Lorena Meneses y Dra. Lenys Fernández, quienes han sido para mí un ejemplo de poder, fuerza y dedicación femenina en el ámbito científico. Su trabajo seguirá siendo una fuente de inspiración para mi futuro investigativo y laboral.

Un especial agradecimiento a mi tutora de tesis, M. Sc. Eliza Jara, por brindarme un inmenso apoyo desde el momento que comenzó el proyecto y ha sido un ejemplo de persona y profesional. Gracias por enseñarme tanto, confiar en mi trabajo y abrir en mi camino grandes oportunidades.

Finalmente, agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por acogerme durante estos años y convertirse en mi segundo hogar. De igual manera, agradezco a PetroEcuador por facilitar las muestras de suelo y al Laboratorio de Combustibles, Biocombustibles y Aceites Lubricantes de la Escuela Politécnica Nacional por la colaboración en la ejecución de este trabajo de titulación.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE ANEXOS	X
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1 MUESTREO	9
4.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	10
4.3 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	11
4.4 EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO	11
4.5 EXTRACCIÓN POR MICRO-SOXHLET	13
4.6 COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	14
4.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR GC-MS	14
4.8 GRADO DE WEATHERING	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	17
5.2 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	17
5.3 COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	19
5.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR GC-MS	23
5.5 GRADO DE WEATHERING	38
6. CONCLUSIONES	45
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8. ANEXOS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del área de muestreo en el campo Charapas.	9
Figura 2. Espectro de masas obtenido de heptadecano (C17) y octadecano (C18) en la muestra E1P1 extraída por Soxhlet junto con sus espectros de referencia.	25
Figura 3. Espectro de masas obtenido de pristano y fitano en la muestra E1P1 extraída por Soxhlet junto con sus espectros de referencia.....	26
Figura 4. Promedio del área de los picos de cada biomarcador de interés en las muestras A, C, E (suelo contaminado) y X (control).....	27
Figura 5. Cromatogramas de la muestra E - profundidad (E1P1) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior).....	28
Figura 6. Cromatogramas de la muestra E – rizósfera (E1R1) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior).....	29
Figura 7. Cromatogramas de la muestra C – profundidad (C1P2) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior).....	30
Figura 8. Cromatogramas de la muestra C - rizósfera (C1R2) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior).....	30
Figura 9. Cromatogramas de la muestra A – profundidad (A1P2) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior).....	31
Figura 10. Cromatogramas de la muestra A – rizósfera (A1R2) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior).....	31
Figura 11. Cromatogramas de la muestra control (X2) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior).....	32
Figura 12. Cromatogramas de la muestra blanco (solvente) extraída por Soxhlet (superior) y por ultrasonido (inferior).	33
Figura 13. Espectros de masas de C ₃₀ αβ-hopano (parte superior) y C ₃₀ αα-hopano (parte inferior).....	38

Figura 14. Cromatograma de ion extraído m/z 191 de la muestra E – profundidad (E1P) extraída por micro-Soxhlet en conjunto con los espectros de masas de los picos con mayor intensidad (> 10 000 cuentas)	39
Figura 15. Cromatogramas de ion extraído m/z 191 de las muestras extraídas por micro-Soxhlet.	40
Figura 16. Cromatogramas de ion extraído m/z 191 de las muestras extraídas por ultrasonido en conjunto con los espectros de masas de los picos en (A) 15,50 y (B) 15,30 minutos.	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas de los analitos de interés.....	6
Tabla 2. Codificaciones de las muestras preparadas con la descripción y ubicación de cada una.	17
Tabla 3. Contenido de humedad en las muestras de suelo tomadas en el campo Charapas.....	18
Tabla 4. Comparación de metodologías de extracción en función del porcentaje de material extraíble y el coeficiente de variación (%CV) obtenido para cada punto	20
Tabla 5. Análisis estadístico para la comparación de los métodos de extracción con base en el contenido de materia extraíble del suelo.....	22

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectros de masas de la muestra A1P2.	55
Anexo 2. Espectros de masas de la muestra A1R2.	56
Anexo 3. Espectros de masas de la muestra C1P2.	57
Anexo 4. Espectros de masas de la muestra C1R1.	58
Anexo 5. Espectros de masas de la muestra E1P1.	59
Anexo 6. Parámetros cromatográficos (Tiempo de retención -TR y área) de los picos de C17, C18, pristano y fitano en todas las muestras analizadas.....	61

1. RESUMEN

La contaminación provocada por los derrames de hidrocarburos de petróleo ha sido considerada como una problemática medioambiental de gran impacto para la salud y desarrollo de comunidades. Por mucho tiempo, una de las soluciones ha sido la implementación de tratamientos de remediación que aceleran la degradación y biotransformación de los contaminantes. Para dar seguimiento y/o determinar la existencia de estos procesos fisicoquímicos se ha recurrido a utilizar lo que se conoce como biomarcadores, moléculas orgánicas que se pueden asociar a diversos grados de transformación de combustibles fósiles en el medio ambiente. Entre los biomarcadores más comunes se encuentran los hidrocarburos ramificados e isoprenoides como el pristano, fitano, n- heptadecano C₁₇, n-octadecano C₁₈ y C₃₀ $\alpha\beta$ -hopano. La presente investigación tuvo como objeto identificar a estos marcadores en una zona contaminada con crudo en el suelo del campo Charapas, provincia de Sucumbíos–Ecuador, mediante el uso del acople cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS), con el fin de verificar la existencia de procesos espontáneos de biorremediación.

Una comparación en los métodos de extracción de los analitos de la matriz suelo determinó que la extracción por micro-Soxhlet resulta ser más eficiente que aquella por ultrasonido, al encontrarse cualitativamente una mayor presencia de dichos compuestos en un mayor número de muestras. Mediante el análisis por GC-MS se logró determinar, en ciertas matrices de suelo, la presencia de pristano, fitano, n- heptadecano y n-octadecano, biomarcadores que muestran indicios de procesos degradativos en la zona contaminada de Campo Charapas. Sin embargo, la metodología aplicada requiere mayor optimización para la determinación confiable de los marcadores seleccionados.

Palabras clave: biomarcadores, biorremediación, degradación, extracción, hidrocarburos.

2. ABSTRACT

Pollution caused by oil hydrocarbon spills has been considered an environmental problem with a significant impact on health and development of communities. For a long time, one of the solutions has been the implementation of remediation treatments that speed up the degradation and biotransformation of pollutants. Biomarkers are organic molecules that can be associated with various degrees of transformation of fossil fuels in the environment, thus resulting useful to monitor or determine the existence of these physicochemical processes; among the most common ones are branched hydrocarbons and isoprenoids such as pristane, phytane, n-heptadecane C₁₇, n-octadecane C₁₈, C₃₀ $\alpha\beta$ -hopane. The purpose of this study was to identify these markers in an area of crude oil polluted soil located in the Charapas field, province of Sucumbíos-Ecuador, by using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) to verify the existence of spontaneous bioremediation processes. A comparison in the extraction methods of the analytes from the soil matrix determined that micro-Soxhlet is more efficient than ultrasound-assisted extraction, as these compounds were identified in a higher number of samples. Through GC-MS analysis it was possible to determine in certain soil matrices the presence of pristane, phytane, n-heptadecane and n-octadecane, biomarkers that suggest degradation processes in the contaminated area of the Charapas field. However, the applied methodology requires further optimization for the reliable determination of the selected markers.

Keywords: biomarkers, bioremediation, degradation, extraction, hydrocarbons.

3. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la contaminación del medio ambiente representa uno de los problemas con mayor impacto sobre la salud y el desarrollo de las comunidades. En Ecuador, la actividad petrolera es una de las que más impactos ambientales y daños en la biodiversidad genera. A pesar de la importancia que existe en nuestro país por preservar la naturaleza, al tener un ecosistema megadiverso, la industria petrolera considera las zonas ricas en vegetación como una frontera para ampliar sus actividades; esto se debe a que, de acuerdo con las percepciones de la industria, es más barato explotar petróleo en zonas amazónicas (Bravo, 2007). Los derrames de hidrocarburos de petróleo son una de las principales fuentes de contaminación de suelos y aguas ya que, ocasionan perturbaciones en los ecosistemas al afectar su estructura y bioprocesos (Pelaez et al., 2016).

Existe un creciente interés por frenar esta contaminación e implementar tratamientos de remediación para zonas que han sido contaminadas. Los principales tratamientos empleados se clasifican en técnicas de aislamiento o encapsulamiento, técnicas de descontaminación fisicoquímicas, técnicas térmicas y tratamientos biológicos (Cando, 2011). Generalmente, los dispersantes químicos empleados en la remediación de suelos contaminados con petróleo suelen ser más perjudiciales que el propio derrame, esto debido a su toxicidad y recalcitrancia a la biodegradación (Pérez et al., 2008). Como consecuencia de este impacto negativo se ha buscado implementar el uso de tratamientos biológicos, como la biorremediación, para limpiar los suelos que se encuentran contaminados con hidrocarburos. En este tipo de tratamientos se aprovecha la capacidad metabólica de microorganismos, sistemas biológicos y plantas para la degradación y biotransformación de los contaminantes (Abasolo & Morante, 2019). En Ecuador, se han realizado investigaciones en esta área desde los años '90, pero Cuví & Bejarano (2015) exponen que gran parte de los resultados no fueron publicados por diversas coyunturas político-administrativas. Oficialmente, entre el 2014 y 2018 el proyecto Amazonía Viva de la empresa estatal Petroamazonas remedió 1,2 millones de metros cúbicos de suelo

contaminado con ayuda de un banco de más de 400 cepas bacterianas (Pacheco, 2019).

Existen microorganismos que son recolectados de las zonas afectadas por la contaminación y sus adaptaciones son estudiadas con el fin de utilizarlas para recuperar la misma zona afectada (Cuvi & Bejarano, 2015). Las bacterias representan los microorganismos más utilizados en remediaciones de suelos contaminados con crudo, sin embargo, no son los únicos empleados para estos procesos. Existen estudios donde se han reportado hongos que exceden las capacidades bacterianas para un degradado biológico de hidrocarburos (Al-Nasrawi, 2012). Un estudio realizado en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador analizó la capacidad biodegradadora de diferentes aislados fúngicos que se obtuvieron de plantas de la Amazonia Ecuatoriana; los resultados presentados sobre la cantidad de individuos degradadores respaldan la teoría de que las plantas estimulan el crecimiento de microorganismos con capacidades para biodegradar hidrocarburos (Marín, 2018).

Para certificar que ha ocurrido una biorremediación de las zonas afectadas, es decir que, el petróleo no se ha evaporado sino degradado, se utilizan lo que se conoce como marcadores biológicos o biomarcadores. Los biomarcadores son compuestos orgánicos presentes en la geosfera que cuentan con estructuras químicas íntimamente relacionadas con sus estructuras precursoras y que a su vez provienen del material fuente del petróleo fósil (Correa, 1996). En un sentido amplio, también se pueden tomar como una medida de cualquier nivel de organización biológica que pueda estar relacionada con el impacto de contaminantes (Bozo et al., 2007). Existen varios biomarcadores que son hidrocarburos saturados provenientes de compuestos oxigenados o insaturados que, debido a los procesos de diagénesis y maduración de combustibles fósiles, encontraron condiciones favorables de transformación. Los biomarcadores más comunes son los n-Alcanos, hidrocarburos ramificados, isoprenoides, sesquiterpenos, diterpenoides,

terpenos tricíclicos y tetracíclicos, esteranos, hidrocarburos aromáticos y porfirinas (Damaison, 1991).

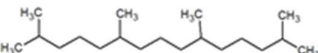
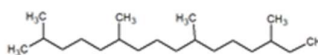
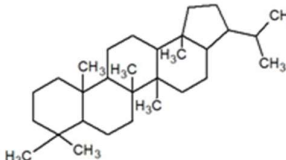
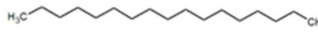
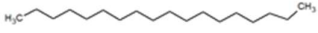
Entre los biomarcadores más reportados se encuentran las relaciones de $n\text{-C}_{17}$ /Pristano y $n\text{-C}_{18}$ /Fitano como indicadores del grado de degradación microbiana (González et al, 2013). Estas expresiones se utilizan con el fin de calcular la relación del peso entre un hidrocarburo que se degrada fácilmente, como son los n-alcanos de 17 y 18 carbonos; y un hidrocarburo de degradación un poco más lenta, como se conoce que son los hidrocarburos ramificados (pristano y fitano) (Prinik, et al., 1977; Mueller et al., 1992) Un estudio de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador detalla el uso de estos índices para evidenciar que existen procesos de biodegradación con hongos en un sustrato contaminado con hidrocarburos utilizando plantas Rye Grass (Mogrovejo, 2019).

El pristano y el fitano (Tabla 1) se conocen por ser isoprenoides que se derivan de la degradación de la clorofila-a. El pristano se forma en condiciones oxidantes y tras reacciones de descarboxilación, mientras que el fitano se genera bajo condiciones reductoras, por hidrogenación y deshidratación (Ortiz et al., 2003). Su constante selección como biomarcadores se debe a que representan los isoprenoides más abundantes en el petróleo. De igual forma cabe mencionar que, los alcanos ramificados se biodegradan de manera más lenta que los alcanos lineales (Ortiz et al., 2003); esto afecta al análisis de zonas contaminadas ya que la utilización de la relación $n\text{-C}_{17}$ /Pristano y $n\text{-C}_{18}$ /Fitano son válidas al comienzo del tratamiento. Si se analiza cuando el proceso ha avanzado mucho, pueden subestimar la biodegradación (Bragg et al., 1994).

Por otra parte, un artículo de Wang et al. (2006) y una publicación de Stroud et al. (2007); presentan al hopano, biomarcador perteneciente a los terpenos tetracíclicos, como un compuesto capaz de determinar las modificaciones debidas al ambiente (*weathering*) que sufre el crudo con el paso del tiempo, principalmente debido a evaporación, dispersión natural,

fotooxidación, emulsificación, sedimentación y adhesión a superficies de materiales particulados en suspensión (Wang & Fingas, 1995). Su uso se debe a que es un compuesto sumamente resistente al ataque biológico y, por consiguiente, proporciona un estándar constante para normalizar el contenido de un hidrocarburo aromático (Han et al., 2019).

Tabla 1. Propiedades físicas de los analitos de interés

Nombre común / IUPAC	Masa molecular g/mol	Estructura química	Densidad a 20°C g/mL	Punto de ebullición °C	Coefficiente de partición (logP)
Pristano / 2,6,10,14-tetrametilpentadecano	268,53		0,783	296,0	9,38
Fitano / 2,6,10,14-Tetrametilhexadecano	282,56		0,791	301,4	9,87
Hopano / (3R,3aS,5aR,5bR,7aS,11aS,11bR,13aR,13bS)-5a,5b,8,8,11a,13b-hexametil-3-propan-2-il-hexadecahidrociclopenta[a]criseno.	412,75		0,952	412,3	10,78
Heptadecano / n-Heptadecano	240,47		0,778	302,0	8,69
Octadecano / n-Octadecano	254,50		0,777	316,3	8,36

Fuente: Elaboración propia con información tomada de PubChem

Tomando en cuenta el tiempo, a un corto plazo, después de un derrame de petróleo superficial, la evaporación suele ser el proceso de *weathering* más importante y dominante particularmente para los productos del petróleo ligero (gasolina). La evaporación tiene el mayor efecto sobre la cantidad de petróleo que queda en la tierra. Se puede considerar que, en los primeros días posteriores a un derrame, la pérdida puede ser de hasta el 70% de volumen de crudo ligero. En el caso de crudos pesados o residuales, las pérdidas debidas a la evaporación comprenden solo un pequeño porcentaje del volumen total. La

velocidad de evaporación depende principalmente de la composición del crudo, mientras más componentes volátiles tenga, mayor será el grado y velocidad de evaporación (Fingas, 1995).

Generalmente, solo la fracción de contaminantes orgánicos hidrófobos disuelta en la fase acuosa está disponible para la degradación microbiológica, mientras que la fracción sorbida tiene una baja disponibilidad (Allan et al., 1997). Además, un suelo contaminado con petróleo degradado normalmente contiene una fracción recalcitrante de compuestos, básicamente, hidrocarburos de alto peso molecular (superiores a C₂₅), los cuales no podrían ser degradados por microorganismos autóctonos. Por otro lado, un suelo recientemente contaminado con crudo contiene una mayor cantidad de compuestos saturados y alifáticos, que son los más susceptibles a la degradación microbiana. No obstante, los compuestos en un suelo recientemente contaminado son potencialmente más tóxicos para los microorganismos nativos, lo que lleva a que se requiera un mayor tiempo de adaptación antes de observar procesos de degradación (Trindade et al., 2005).

A nivel analítico, para estudiar mezclas complejas de compuestos como las de hidrocarburos provenientes de derrames de petróleo y procesos de remediación asociados a éstos, se suelen emplear técnicas tales como: cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de columna, cromatografía en fase gaseosa (GC), cromatografía multidimensional, separaciones gravimétricas y extracciones con base en mezclas de solventes orgánicos. Estudios de Wang y Fingas (1995, 2006 & 2013) evidencian el empleo de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas como la técnica analítica más utilizada para obtener resultados óptimos. De manera más específica, las técnicas de análisis necesarias a combinar serían la cromatografía de gases y la espectrometría de masas (MS), con monitoreo de ion simple e ion múltiple (Wolicka & Borkowski, 2012). La cromatografía de gases es una técnica que tiene el poder de separar mezclas muy complejas, pero no permite obtener una buena identificación de compuestos. Acoplar esta técnica

con la espectrometría de masas, que permite identificar casi inequívocamente cualquier sustancia pura, genera una técnica que permite separar e identificar mezclas complejas con mayor eficacia (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Utilizando esta herramienta analítica, en el presente estudio se presenta la evaluación de una zona contaminada por crudo en el Campo Charapas, provincia de Sucumbíos-Ecuador, con el fin de evidenciar procesos de biorremediación espontáneos debido a la presencia de microorganismos. Un primer indicio de este fenómeno es la presencia de abundante vegetación que ha colonizado la zona afectada. Se logró identificar compuestos biomarcadores como pristano, fitano, n- heptadecano C₁₇ y n-octadecano C₁₈ en muestras de suelo a distintas profundidades, constatando la existencia de una degradación de crudo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Identificar compuestos biomarcadores en una zona contaminada con crudo en el suelo de Campo Charapas, provincia de Sucumbíos- Ecuador mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para verificar la existencia de procesos de biorremediación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Seleccionar el método de extracción más eficiente para la identificación de biomarcadores en suelo.
2. Identificar los biomarcadores asociados a procesos de biodegradación en las muestras de suelo del campo Charapas mediante análisis por GC-MS.
3. Evaluar el grado de *weathering* de un estanque de petróleo del campo Charapas a través del uso de biomarcadores.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MUESTREO

Se realizó un muestreo de suelo en el interior de una piscina de petróleo ubicada en el campo Chaparas, provincia de Sucumbíos, en la región Amazónica al noreste del Ecuador, un área de alrededor de 24,358 hectáreas, predio perteneciente a PetroAmazonas EP, localizado en las coordenadas O 76 ° 48 '57 "- S 00 ° 11' 49" (área aproximada 330 m²).

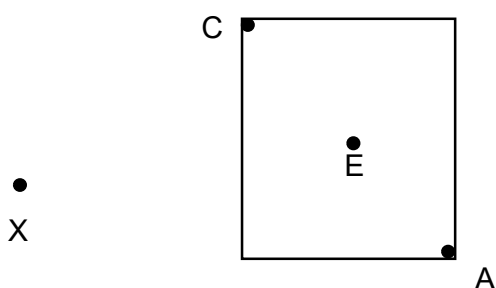


Figura 1. Esquema del área de muestreo en el campo Charapas. Parte superior: fotografía de la zona de estudio, la parcela perteneciente a la piscina de petróleo se encuentra del lado izquierdo; imagen tomada por Ana Gordillo. Parte inferior: esquema de los puntos de muestreo; X es la muestra control tomada a 100 m de distancia; puntos de muestreo C y A, esquinas de la parcela; punto E, zona central; la imagen no se encuentra a escala.

Se tomaron muestras en 3 puntos de la zona determinada a 2 profundidades diferentes, de 0 a 15 cm (codificadas como R) y de 40 a 60 cm (codificadas como P), y adicionalmente, una muestra a nivel superficial en un punto no contaminado (codificada como X) fuera de la zona de la piscina, a aproximadamente 100 m de distancia de la zona afectada. Los puntos en los cuales se tomaron las muestras están representados en la Figura 1. Los puntos A, C son las esquinas que delimitan la zona contaminada y el punto E fue tomado en el centro de la zona. Se tomaron 3 réplicas de muestras en cada punto a las dos profundidades, se almacenaron en fundas de polietileno y se las mantuvo almacenadas a 4 - 7 °C hasta su procesamiento en el laboratorio.

4.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras previamente almacenadas se sacaron de refrigeración aproximadamente una hora antes de su procesamiento. Una vez a temperatura ambiente, se realizó la homogeneización y el cuarteo correspondiente a cada punto; no se logró hacer un tamizaje ya que las muestras contenían mucha contaminación de crudo, lo que les confiere una textura pegajosa. Es por esto que, se retiró de forma manual cualquier rastro de material vegetal de gran tamaño; como lo son raíces, tallos, hojas, etc., y se disgregaron los trozos de suelo para que la muestra esté homogénea.

En el caso de las muestras provenientes de la piscina, se obtuvo una muestra compuesta con porciones iguales de las 3 réplicas de cada punto. Una vez cuarteadas las muestras homogéneas, se tomaron porciones en dos tubos Falcon (polipropileno) de 50 mL debidamente rotulados, indicando el punto de muestreo y la profundidad. Los tubos fueron almacenados en congelación (-18°C) hasta el análisis de humedad, y luego en refrigeración (4°C) hasta el momento de la extracción de los analitos. Los tubos con la muestra control se mantuvieron separados en fundas ziploc para evitar cualquier contaminación durante la manipulación y/o almacenamiento.

4.3 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

La determinación de la humedad corresponde a una medición gravimétrica ampliamente utilizada para determinar únicamente la cantidad de agua en los suelos. La humedad del suelo se calcula por la diferencia de peso entre una muestra húmeda y la misma después de haber sido sometida a secado en estufa hasta obtener un peso constante.

Se tomaron como referencia los métodos ASTM D2216-98 y el descrito por Topp et al. (1933). Brevemente, se tomaron 14 cápsulas de porcelana las cuales se lavaron solo con agua y marcaron para introducirlas en la estufa MEMMERT 400 durante 24 horas a 80°C para que alcancen peso constante; una vez secas se colocaron en un desecador durante una hora. Se pesaron las cápsulas en una balanza analítica BOECO 220GRX y en cada cápsula se colocó 1,00 g de muestra para después colocarlas nuevamente dentro de la estufa a 80 °C por 24 horas. Finalmente, se pesaron las cápsulas con muestra seca para calcular el porcentaje de humedad en el suelo por la diferencia de pesos, aplicando la Ecuación 1.

$$\% \text{ Humedad de suelo} = \frac{(\text{Masa inicial} - \text{Masa final})}{\text{Masa inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

4.4 EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO

La extracción por baño ultrasónico representa una técnica de extracción sencilla y ampliamente utilizada para someter una muestra sólida en contacto con un disolvente. En este tratamiento la muestra es sometida dentro de un baño que produce una cavitación del disolvente alrededor de las partículas de la matriz, aumentando el contacto con el solvente y mezclándolo con la muestra (Viera & Fernández, 2020).

Para la extracción ultrasónica se siguió lo establecido por Wang (2006) donde como primer punto se pesó 1 g de muestra de suelo en un Erlenmeyer al cual se le agregó 3 g de sulfato de sodio (MERCK) anhidro para secarlo. Se mezcló y agregó 10 mL de una mezcla Hexano (MERCK) /DCM (Diclorometano

MERCK) en una relación 1:1 (v/v). Con esto se colocaron las muestras en un baño de ultrasonido BRANSON 3800 por 5 minutos en 2 repeticiones. El extracto obtenido se filtró con lana de vidrio (MERCK) y se recogió en otro erlenmeyer limpio y seco. Nuevamente las muestras volvieron a extracción con 10 mL de DCM solo, siguiendo el mismo procedimiento, por dos ocasiones más. Los extractos, en ambas ocasiones, se filtraban y combinaban con los anteriores. A las muestras que visualmente aún contaban con hidrocarburos (coloración oscura y opaca en la última extracción) se les realizó una extracción adicional con 10 mL de DCM. Los extractos combinados se los llevó a sequedad en estufa durante 12 horas a 33°C.

Para reconstituir el residuo seco de cada extracto, se les agregó 10 mL de hexano en los casos de muestras con mucho hidrocarburo y 5 mL al resto de muestras. En caso de que no se disolviera el residuo seco, se utilizó un baño ultrasónico para que las muestras estén totalmente disueltas y homogéneas. Se determinó el porcentaje de material extraíble (Ecuación 3) y para esto se tararon y pesaron tubos de ensayo (75 x 12 mm), en los cuales después se puso una alícuota de 1 mL de cada extracto y se los llevó a la estufa a 33 °C hasta sequedad. El tubo con el material extraíble seco se pesó en una balanza y se aplicó el cálculo de las ecuaciones 2 y 3. Finalmente, el resto de los extractos se trasvasaron a un vial ámbar (AGILENT TECHNOLOGIES) de 2 mL para su análisis por GC-MS.

$$g \text{ Material Extraíble} = (Masa \text{ tubo} + Extracto \text{ seco}) - Masa \text{ tubo}$$

Ec. 2

$$\% \text{ Material Extraíble} = \frac{Material \text{ extraíble (g)} \times Factor \text{ de dilución} \times 100}{Masa \text{ de muestra usada en la extracción (g)}}$$

Ec. 3

4.5 EXTRACCIÓN POR MICRO-SOXHLET

En este caso la técnica consiste en extraer los hidrocarburos contenidos en el suelo mediante la acción continua de un solvente orgánico volátil apropiado, que se encuentra en constante reflujo, percolando a través de la muestra durante un tiempo determinado. El solvente es evaporado y posteriormente condensado por un refrigerante, pasa por la muestra y regresa al origen para nuevamente ser evaporado (US EPA, 1996). El protocolo empleado en esta investigación se fundamenta en el método USEPA 3540C y en el trabajo de Arias (2011).

Para la extracción por micro-Soxhlet se colocó 1 g de muestra de suelo en un vidrio de reloj junto con 1 g de sulfato de sodio (MERCK) anhidro en relación 1:1 y se mezcló; la mezcla se introdujo en un cartucho de papel filtro de dimensiones de 5 x 1,5 cm aproximadamente. En ciertas muestras se pesó 0,75 g por la alta cantidad de hidrocarburos que contenía el suelo, a fin de evitar la saturación del solvente de extracción. Se colocó cada cartucho conteniendo las muestras dentro de la columna extractora del equipo micro-soxhlet y en los matraces de base redonda se introdujeron 20 ± 5 mL de diclorometano junto con núcleos de ebullición. Se ensambló el equipo e inició el calentamiento colocando las planchas de calefacción MISUNG MS 100 hasta una temperatura que permita la ebullición del solvente. Se mantuvo el reflujo en estas condiciones por 2 horas, de tal manera que se efectuaron entre 6 y 8 reflujo por hora, lo que permitió la extracción de los analitos. Al término del tiempo, en la última sifonada se verificó que el solvente en contacto con el cartucho estuviera transparente.

El extracto orgánico obtenido fue evaporado a sequedad en una estufa a 33°C y se reconstituyó el concentrado con 1 mL de DCM para su análisis en GC-MS. En ciertas muestras muy contaminadas se utilizó 1,5 mL de solvente. El extracto fue colocado en un ámbar (Agilent Technologies) de 2 mL. Finalmente, se tararon y pesaron tubos de ensayo en los cuales después se tomaron alícuotas de 100 μ L de cada extracto con ayuda de una pipeta de volumen variable TOPSCIEN (20 a 200 μ L) y se los llevó a la estufa a 33°C hasta sequedad. El residuo se pesó en una balanza para obtener el material total

extraíble con solvente, según el cálculo mostrado en las ecuaciones 2 y 3. El resto del extracto se almacenó para su posterior análisis.

4.6 COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Para determinar la efectividad de las extracciones se compararon ambos métodos por medio del cálculo del porcentaje de material extraíble. Los análisis de cada muestra se realizaron por duplicado y se determinó el coeficiente de variación para verificar la repetibilidad de los resultados y evidenciar que no exista dispersión entre los valores. Según los datos reportados en la AOAC (2011) se establece que los criterios de aceptación recomendados para métodos analíticos de repetibilidad son de entre 1% y 30% dependiendo de la concentración del analito, para nuestros resultados consideraremos aceptables valores menores o igual al 15%. Se debe tomar en cuenta la cantidad de muestra y analito que se está tratando ya que la imprecisión de un método aumenta a medida que disminuye la concentración de analito (Little, 2016).

Se compararon ambos métodos con la herramienta estadística de la prueba t para la medida de dos muestras emparejadas. Para la interpretación de los resultados se establecieron los siguientes criterios de aceptación: se estableció como hipótesis nula que no existe diferencia significativa entre ambos métodos y como hipótesis alternativa, que la diferencia es estadísticamente significativa. Se utilizó un nivel de significancia de 0,05, y se tomó en cuenta el valor p para dos colas; si dicho valor es mayor que el nivel de significancia, se acepta la hipótesis nula, caso contrario, se la rechaza.

4.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR GC-MS

En la cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia de su repartición entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. La muestra vaporizada se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica y su elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil (gas inerte). En este caso, la fase móvil solo tiene como función transportar el analito por la columna, la misma

que se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. Al salir de la columna, las moléculas de analito entran al espectrómetro de masas, donde se convierten en iones al aplicarles energía. Los iones formados se separan de acuerdo con su relación masa-carga (m/z) y se dirigen a un transductor que convierte el número de iones (abundancia) a una señal eléctrica (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Los extractos fueron analizados en un cromatógrafo de gases (AGILENT 7890B) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador tipo cuadrupolo simple (AGILENT 5977B MSD). Para la separación se empleó una columna capilar de sílice fundida HP-5MS (AGILENT) con dimensiones 30 m x 250 μm x 0,25 μm ; con ayuda de un automuestreador (AGILENT 7693A) se colocó un volumen de inyección de 1 μL . La introducción de la muestra fue a 250 °C, en modo Splitless con un flujo 90 mL/min empleando Helio como gas portador. La temperatura inicial del horno fue de 50 °C, manteniéndola por 1 minuto, luego se subió a 140 °C a una velocidad de 25 °C/min y después hasta 300 °C a una velocidad de 10 °C/min. En cuanto a la detección mediante espectrometría de masas, se realizaron corridas en modo SCAN, con un barrido de masas entre 29 a 550 m/z ; para la ionización por impacto electrónico (EI) se suministró una energía de 1007 eV mientras la fuente de electrones se encontraba a 230 °C. La interfase entre el GC y el MSD se mantuvo a 150 °C.

Los cromatogramas y espectros de masas obtenidos se analizaron en el software abierto *OpenChrome* (Lablicate versión 1.4.0.202109161221). Para cada analito se obtuvo el espectro de masas, confirmándolo mediante la comparación con bibliotecas espectrales tales como: NIST Chemistry Book (SRD 69), PubChem y SpectraBase (Wiley). En el caso del biomarcador hopano, se procedió a obtener los cromatogramas de ion extraído (XIC) para el ion base, 191 m/z , con el fin de filtrar los resultados y conseguir una información espectral más clara.

4.8 GRADO DE WEATHERING

La evaluación del grado de “weathering” permite predecir, con relativa certeza, el tiempo de residencia y el tipo de compuestos que se generaron durante un derrame de petróleo (Reyes et al., 2014) a través de la medición de C_{30} $\alpha\beta$ -hopano con la Ecuación 4.

$$P(\%) = \frac{C_s}{C_w} \times 100\% \quad \text{Ec. 3}$$

Donde, P representa el porcentaje de intemperie de las muestras erosionadas. C_s y C_w son las concentraciones de C_{30} $\alpha\beta$ -hopano en el crudo inicial y en las muestras, respectivamente (Wang et al., 2001).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras previamente homogeneizadas y almacenadas en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL se codificaron según lo descrito en la Tabla 2.

Tabla 2. Codificaciones de las muestras preparadas con la descripción y ubicación de cada una.

<i>Código</i>	<i>Descripción</i>	<i>Ubicación</i>
X ₁	Muestra control punto X, superficial 5-20 cm	100 m de distancia de la parcela
A ₁ P	Punto A, profundidad 40-60 cm	Esquina inferior derecha de la parcela
A ₁ R	Punto A, rizosfera 0-15 cm	
C ₁ P	Punto C, profundidad 40-60 cm	Esquina superior izquierda de la parcela
C ₁ R	Punto C, rizosfera 0-15 cm	
E ₁ P	Punto E, profundidad 40-60 cm	Centro de la parcela
E ₁ R	Punto E, rizosfera 0-15 cm	

En el caso de la muestra control X, la textura del suelo era de carácter arcilloso y a simple vista se podía diferenciar del resto de muestras por la aparente ausencia de hidrocarburos, identificada por el olor y color que presentaba. Las muestras tomadas dentro de las parcelas en su mayoría se componían de crudo por lo que tenían una textura pegajosa y un color más oscuro.

5.2 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Como se puede observar en la Tabla 3, se realizó la determinación del porcentaje de humedad en 7 muestras por duplicado, teniendo un total de 14 mediciones. Se obtuvieron resultados con gran variación entre los distintos

puntos de muestreo debido a las características del suelo en cada sector. En la mayoría de los casos, las muestras tomadas a profundidad eran las más contaminadas y sus porcentajes de humedad eran más bajos ya que, a simple vista, se apreciaba una mayor cantidad de crudo, lo que le brinda mayor hidrofobicidad a la matriz suelo.

Tabla 3. Contenido de humedad en las muestras de suelo tomadas en el campo Charapas.

Muestra	Réplica 1 (%)	Réplica 2 (%)	Promedio	%CV
X ₁	42,80	43,33	43,07	0,86
A ₁ P	82,08	79,61	80,85	2,16
A ₁ R	75,22	74,27	74,74	0,90
C ₁ P	72,98	75,01	74,00	1,94
C ₁ R	91,56	87,40	89,48	3,28
E ₁ P	49,92	57,60	53,76	10,10
E ₁ R	92,12	91,99	92,06	0,10

El suelo de rizosfera presentó un porcentaje alto de humedad, demostrando así que, al ser un suelo de textura arcillosa, presenta baja permeabilidad y por consiguiente una elevada retención de agua y nutrientes. Como se puede ver en la Tabla 3, la muestra control presentó un porcentaje de humedad promedio de 43,07 %, que, al comparar con valores de referencia reportados, se encuentra dentro del rango de humedad de un 40 % a 50 % atribuido a suelos arcillosos (Datta et al., 2017; Kramarenko et al., 2016). Es importante notar que en el punto E, ubicado en el centro de la parcela, se obtuvieron las mayores diferencias entre las muestras de distintas profundidades, ya que a 40-60 cm (E1P) tiene un porcentaje de humedad en promedio de 53,76 %, valor un poco bajo en comparación a los demás puntos. Sin embargo, en el caso de la rizosfera (E1R) se encontró el mayor porcentaje de humedad de todas las mediciones, con un promedio de 92,06 %.

Los microorganismos que intervienen en una bioremediación cuentan con límites de tolerancia para condiciones ambientales particulares, esto con el fin de establecer sus condiciones óptimas para un desempeño máximo. Entre los factores que afectan un proceso de biorremediación se encuentra el contenido de humedad, la temperatura, el pH, el oxígeno, la textura del suelo y la disponibilidad de nutrientes (Walworth et al., 2005; Cho et al., 2000). En el caso de procesos de bioremediación, se debe considerar mantener la humedad del suelo en un rango óptimo ya que, todos los microorganismos que se encuentran allí requieren de la humedad para su crecimiento y función (Walworth et al., 2005). La disponibilidad de agua afecta la difusión de agua y nutrientes que son solubles dentro y fuera de las células de los microorganismos. Los niveles bajos de humedad disminuyen la actividad microbiana, mientras que el exceso de agua puede crear resistencia a la transferencia de oxígeno y llegar a producir lixiviados no deseados (Haghollahi et al., 2016). Este rango óptimo depende del tipo de suelo, la distribución del tamaño de los poros y la textura del suelo.

Al tener resultados que muestran un alto porcentaje de humedad en las muestras contaminadas con relación a la muestra control y al valor de referencia, se tomó en cuenta lo expuesto por Zahermand et al. (2020) donde se menciona que este suceso se puede deber a que el crudo ha sido absorbido en el espacio de la capa intermedia del suelo arcilloso, creando un volumen suficiente para la penetración del agua y provocando un aumento en el espesor de la doble capa del suelo. Esto se puede explicar también con la teoría de la doble capa, cuando las partículas de arcilla están rodeadas por el crudo, no se forma una doble capa de aceite y arcilla, por lo que aumenta la humedad.

5.3 COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Después de realizar las extracciones para las muestras de suelo contaminado, se procedió a calcular el material extraíble obtenido con ambos métodos de extracción, con el fin de comparar su desempeño.

Tabla 4. Comparación de metodologías de extracción en función del porcentaje de material extraíble y el coeficiente de variación (%CV) obtenido para cada punto

	Extracción por ultrasonido		Extracción con micro-Soxhlet	
	% Material extraíble	%CV	% Material extraíble	%CV
X	0,088	20	0,063	7,4
A1R	6,1	3,5	12	11
A1P	7,7	7,8	3,8	9,1
C1R	0,40	8,8	1,7	8,6
C1P	11	6,9	10	7,4
E1R	0,28	13	0,082	20
E1P	17	11	21	13
Blanco	0,038	47	0,025	28
<i>n = 2</i>				

El porcentaje de materia extraíble refleja el rendimiento de cada metodología. En los resultados de la Tabla 4 se observan, en general, valores similares entre ambos métodos, demostrando que con los dos logran extraer compuestos no polares. El coeficiente de variación cambia de acuerdo con el tipo de muestra, siendo más alto en los blancos y muestras control, ya que representaban las muestras con menor presencia de hidrocarburos, y por tanto una pequeña variación de la masa de material extraíble conduce a una gran variación en el porcentaje calculado con la ecuación 3. Los porcentajes de material extraíble más altos los tienen las muestras tomadas a profundidad y representan las muestras más contaminadas, guardando correspondencia con lo descrito en la sección 5.1.

Estudios de Pons-Jimenez et al. (2011), Martínez-Chávez et al. (2017) y Hernández et al. (2016) han establecido que la extracción con Soxhlet es el recurso más empleado para la extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo. En concordancia con nuestros resultados (Tabla 4) se puede decir que el método EPA 3540c (1996) de extracción por Soxhlet, en el cual se emplea diclorometano como solvente, es el método que otorga una mejor

recuperación. Esto se debe a que se tiene un sistema de recirculación cerrado en el cual la muestra de suelo se mantuvo en constante contacto con el solvente encargado de la extracción, maximizando así la transferencia de masa, y a que el diclorometano es más afín a las familias de hidrocarburos presentes en el crudo, como son asfaltenos y resinas (Adams et al., 2008). Se ha reportado que la elección del método está condicionada por la elección del disolvente, tiempo de extracción y tipo de suelo. Existen casos en donde se encuentra recuperación más alta al usar hexano o metanol como disolventes en un sistema Soxhlet, así como también al utilizar diferentes métodos de extracción como por reflujo o por ultrasonido (Pons-Jiménez et al., 2011). De igual manera se puede hacer mención que para la efectividad de un método se debe considerar la masa molar de los hidrocarburos y sus características estructurales, ya que estas influyen mucho en el potencial de una extracción. El estudio de Viera & Fernández et al., (2020) hace mención que los hidrocarburos aromáticos policíclicos de baja masa molar son mejor extraídos con Soxhlet mientras que los de masa molar media y alta no cuentan con diferencia significativa de extracción entre Soxhlet y ultrasonido.

En cuanto al análisis estadístico de los datos, en la Tabla 4 los resultados obtenidos se presentan en función de la repetibilidad de las extracciones mediante el cálculo del % CV, ya que este permite comparar las dispersiones de las repeticiones realizadas para una misma muestra. Se puede observar que, en la mayoría de los casos, los coeficientes de variación se encuentran en un porcentaje menor al 15%, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos. Esto con el fin de demostrar que los valores no se encuentran tan dispersos. Así mismo, existen muestras como los blancos (Bla1,2), las muestras control (X1,2) y las muestras del punto E de rizosfera (E1R1, E1R2), en las cuales se observan coeficientes altos, es decir mayores que los recomendados por la AOAC (2011) para evaluar repetibilidad de un método de análisis en función de la concentración de analito. Esto se debe a que la cantidad de materia extraída era mínima, provocando solo una variación en el cuarto decimal entre repeticiones y que, al aplicar la fórmula se obtenga un valor elevado en la desviación estándar relativa.

En algunos casos, se observan porcentajes de material extraíble diferentes entre métodos para una misma muestra, por lo cual se empleó la prueba t pareada para establecer la existencia de diferencias significativas. Como se detalla en la Tabla 5, en la primera prueba se consideraron todos los valores, la segunda prueba solo las muestras con bajo contenido de materia extraíble, y la tercera prueba se realizó con las muestras de suelo que mostraron un alto porcentaje de materia extraíble; la clasificación se realizó con base en el conjunto de datos, siendo “alto” un valor mayor o igual a 4. Se realizaron las tres pruebas para verificar la significancia en los distintos rangos de porcentaje de material extraíble.

Tabla 5. Análisis estadístico para la comparación de los métodos de extracción con base en el contenido de materia extraíble del suelo.

		Extracción por ultrasonido	Extracción con micro-Soxhlet
TD	Promedio	5,3219	6,04906
	Varianza	40,1425	57,8773
	Observaciones	8	8
	Grados de libertad		7
	P(T<=t) dos colas		0,5193
BCME	Promedio	0,2542	0,6267
	Varianza	0,0247	0,9214
	Observaciones	3	3
	Grados de libertad		2
	P(T<=t) dos colas		0,5218
ACME	Promedio	10,4438	11,6219
	Varianza	23,6814	51,5267
	Observaciones	4	4
	Grados de libertad		3
	P(T<=t) dos colas		0,6380

TD: todos los datos; BCME: muestras de suelo con bajo contenido de materia extraíble (X, C1R, E1R); ACME: muestras de suelo con alto contenido de materia extraíble (A1R, A1P, C1P, E1P).

Como se dijo anteriormente, para nuestros resultados se consideró $P(T \leq t)$ de dos colas, que es el valor p para la forma de dos colas de la prueba t . Debido a que nuestro valor p es mayor que el nivel de significancia estándar de 0.05, se acepta la hipótesis nula: para el porcentaje de materia extraída por ambos métodos no existe una diferencia significativa. De igual forma, al agrupar los datos de acuerdo con la cantidad de materia extraíble (alta y baja) se obtienen valores similares y se considera la misma interpretación.

De acuerdo con este análisis, a pesar de que el porcentaje de material extraído por ultrasonido es menor, la diferencia no es significativa con la extracción por Soxhlet. Estos resultados concuerdan con los estudios citados anteriormente (Adams, 2008, Pons-Jiménez et al., 2011, Viera y Fernández et al., 2020), los cuales sugieren que la técnica Soxhlet tendría ventajas para recuperación de los analitos de interés (pristano y fitano, hidrocarburos ramificados, y heptadecano y octadecano, hidrocarburos lineales, y el hopano, hidrocarburo policíclico), pero que, las diferencias con la extracción asistida por ultrasonido serían no significativas. En estos casos conviene considerar criterios adicionales para valorar un método, como por ejemplo el costo, la disponibilidad de recursos, el tiempo, entre otros. En este sentido, una ventaja adicional desde el punto de vista operacional es que el protocolo empleado para la técnica micro-Soxhlet es menos susceptible a errores, comparado con aquel empleado en la extracción por ultrasonido. Sin embargo, en nuestro caso el criterio principal es la presencia de los biomarcadores, conforme a los resultados presentados en la siguiente sección.

5.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR GC-MS

Para identificar los tiempos de retención de los analitos de interés se revisaron los espectros de masa de los picos observados en la muestra del punto E tomadas a profundidad (E1P) de la extracción por Soxhlet, al ser el cromatograma con la presencia de mayor cantidad de analitos en todo el conjunto de muestras. En las Figuras 2 y 3, se presentan los espectros de masas de referencia, tomados de la biblioteca espectral NIST, en comparación con los

espectros obtenidos en la muestra E1P. Una vez atribuida la identidad de los compuestos, se fijó el tiempo de retención de cada analito de la siguiente manera: C₁₇ 10,33 min, pristano 10,39 min, C₁₈ 11,34 min y fitano 11,44 min.

La identificación de los analitos mediante sus espectros de masas permitió establecer de manera certera el tiempo de retención y el orden de elución de los compuestos mencionados. Se observaron mínimas variaciones en cuanto a los tiempos de retención de cada analito: C₁₇ ($10,334 \pm 0,004$ min), pristano ($10,396 \pm 0,004$ min), C₁₈ ($11,336 \pm 0,005$ min) y fitano ($11,436 \pm 0,004$ min); mientras que, el orden de elución de los compuestos concuerda con lo reportado por Kenig et al. (2005) y Mogrovejo (2019), quienes emplean fases estacionarias similares a la utilizada en este trabajo. Una vez identificados los analitos, se procedió a la integración de los picos de cada muestra; en todos los casos se verificó la identidad del compuesto mediante el espectro correspondiente (Anexos 1-5).

Con la información de los cromatogramas (post-integración) se construyó la Figura 4, estableciendo de forma gráfica una comparación del promedio de las áreas de los picos de interés en todas las muestras analizadas. Los valores numéricos de las áreas, así como los tiempos de retención de los picos para cada muestra se detallan en el Anexo 6.

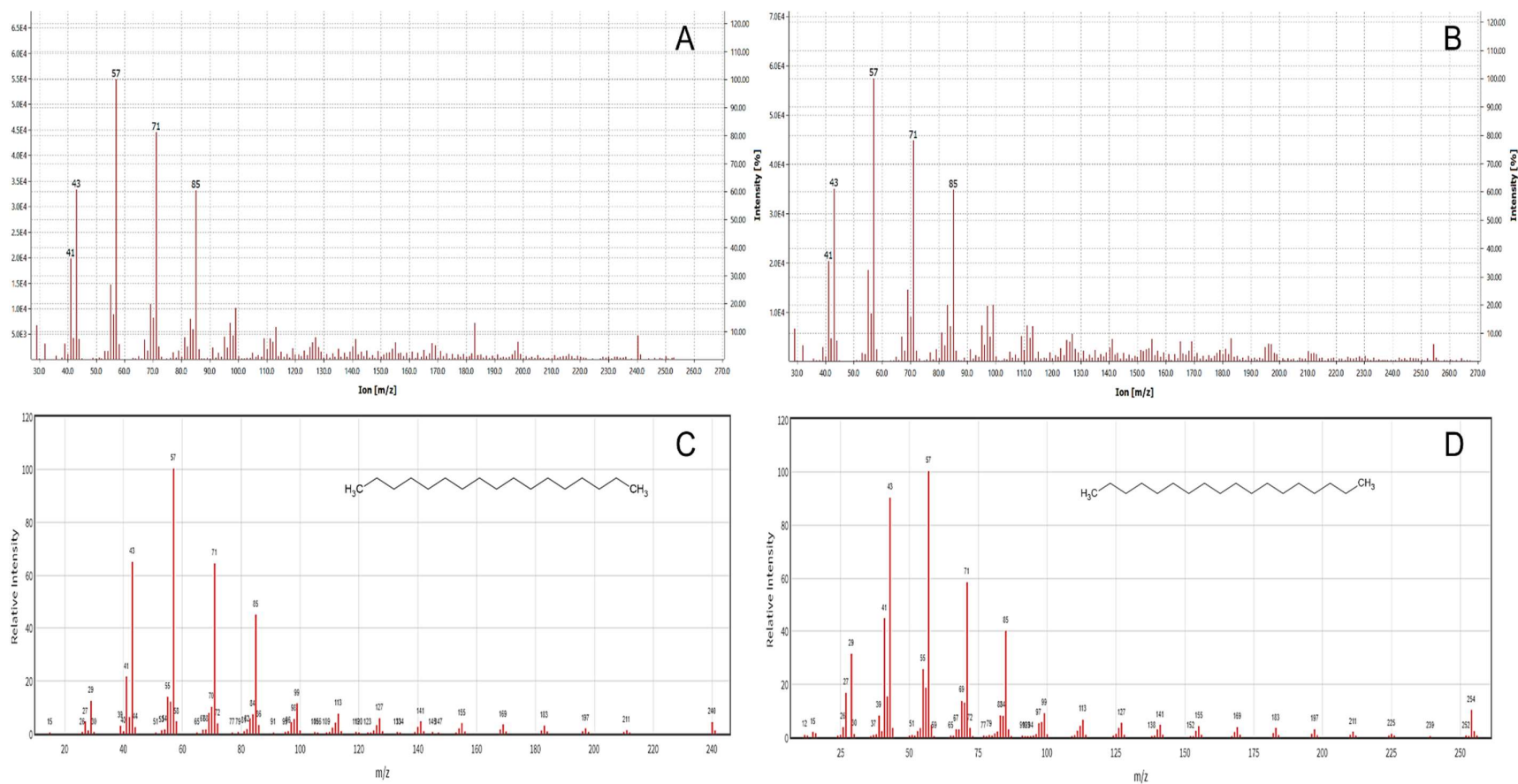


Figura 2. Espectro de masas obtenido de heptadecano (C17) y octadecano (C18) en la muestra E1P1 extraída por Soxhlet junto con sus espectros de referencia. (A) Espectro de masas de C17 en la muestra E1P1; (B) Espectro de masas de C18 en la muestra E1P1, (C) Espectro de masas de referencia de C17; (D) Espectro de referencia de C18.

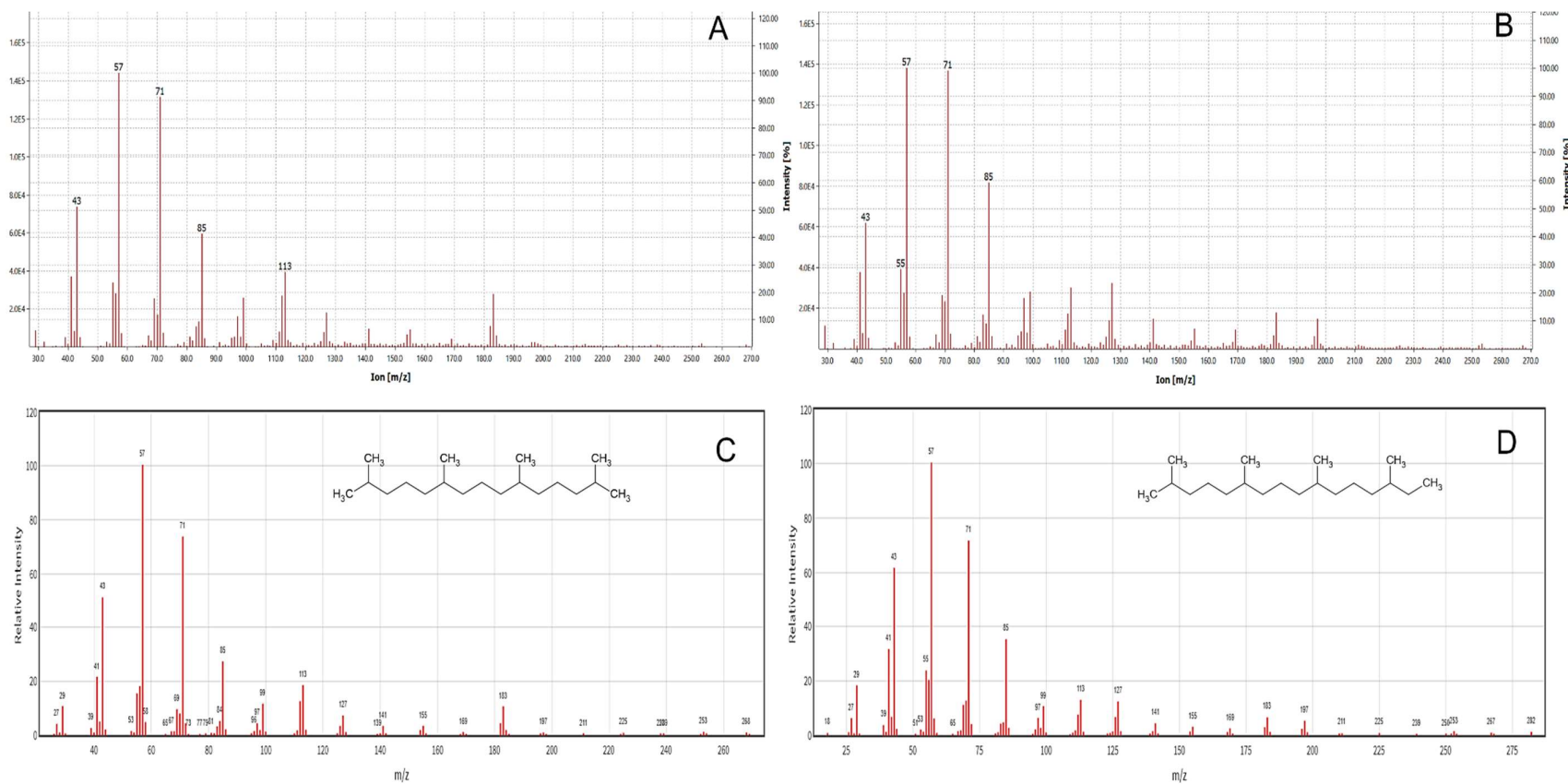


Figura 3. Espectro de masas obtenido de pristano y fitano en la muestra E1P1 extraída por Soxhlet junto con sus espectros de referencia. (A) Espectro de masas de pristano en la muestra E1P1; (B) Espectro de masas de fitano en la muestra E1P1, (C) Espectro de masas de referencia de pristano; (D) Espectro de referencia de fitano.

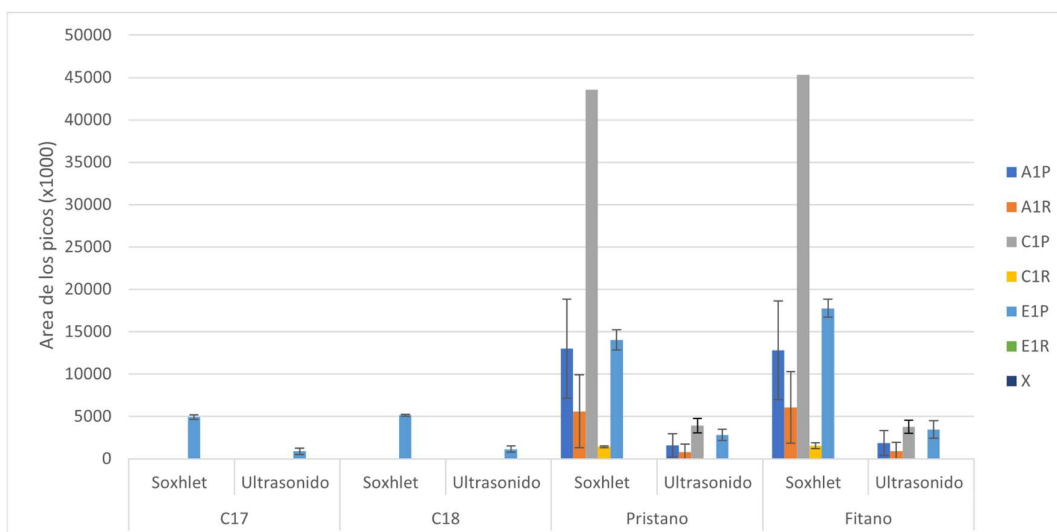


Figura 4. Promedio del área de los picos de cada biomarcador de interés en las muestras A, C, E (suelo contaminado) y X (control). La gráfica representa una comparación del área promedio de los picos de C₁₇, C₁₈, pristano y fitano de las muestras extraídas mediante Soxhlet y ultrasonido a profundidad (P) y en la rizosfera (R). Gráfica construida con base en la integración de los picos de los cromatogramas mostrados en las Figuras 5 – 12.

En la Figura 4 se puede observar que en las muestras tomadas a profundidad (P) existe una mayor presencia de C₁₇, C₁₈, pristano y fitano, en comparación con las muestras tomadas en la rizosfera (R). De forma más específica, se puede decir que en las muestras A1P, A1R, C1P, C1R, E1P y X se encontró la presencia de los biomarcadores pristano y fitano, y en las muestras E1P se logró observar también la presencia de C₁₇ y C₁₈. Por otro lado, la muestra control X1 de la extracción por Soxhlet demostró tener presencia de los biomarcadores de interés, pero al ser la única muestra control que presenta estos resultados, se dedujo que se puede deber a diferentes factores: contaminación en la preparación de la muestra o a la existencia de un *carry over* en el análisis.

A continuación, en las Figuras 5 a 12, se detalla una comparación de los cromatogramas obtenidos para cada muestra extraída mediante micro-Soxhlet y por ultrasonido. Se tomó en cuenta el rango de 9 a 14 minutos y se realizó un acercamiento a 40% de intensidad en el eje y para facilitar la apreciación de los picos; todas las imágenes se encuentran en la misma escala.

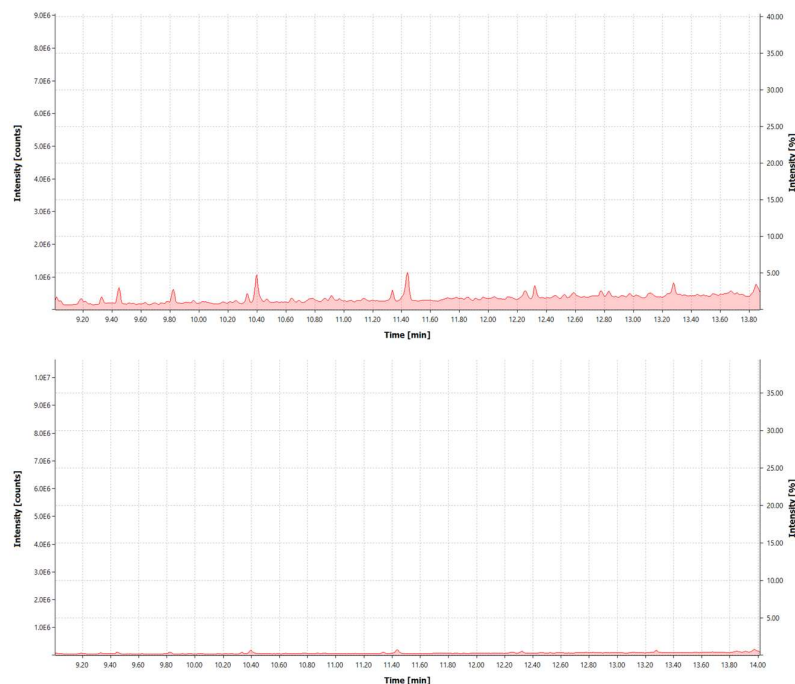


Figura 5. Cromatogramas de la muestra E - profundidad (E1P1) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior). Se muestra solamente la sección donde eluyen los compuestos de interés.

Los cromatogramas de las muestras EP fueron los únicos que permitieron observar claramente los 4 picos de los analitos de interés. Se observa claramente en la Figura 5 como el cromatograma de la muestra E1P1 extraída con micro-Soxhlet presenta picos de mayor intensidad, estrechos y bien resueltos, en comparación a los picos que se presentan en el cromatograma de las muestras extraídas por ultrasonido. Al comparar con la Figura 6, se observa también una clara diferencia con las muestras E1R, ya que en estas muestras no se logró evidenciar presencia de ningún biomarcador. Estos resultados corroboran las observaciones realizadas durante la preparación de muestras, ya que el suelo del punto E en profundidad era el más contaminado, mientras que, en el mismo sitio, pero a nivel de la rizósfera era, en apariencia, más limpio.

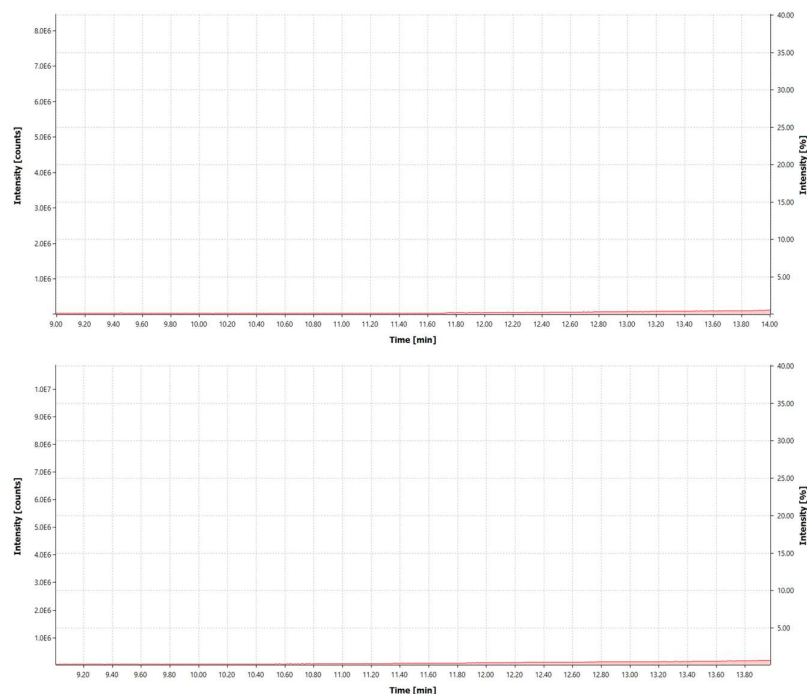


Figura 6. Cromatogramas de la muestra E – rizósfera (E1R1) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior). Se muestra solamente la sección donde eluyen los compuestos de interés.

Las muestras tomadas en el punto C presentaron una variabilidad notoria atribuible a la técnica de extracción; claramente se observa en los cromatogramas que las muestras extraídas por ultrasonido no permiten ver con claridad los picos de interés, ya que la intensidad con la que se presentan es demasiado baja. Como previamente se menciona, la muestra del punto C a profundidad (C1P) tiene presencia de los biomarcadores pristano y fitano, tal como se ve en la Figura 7, al contrario de la muestra de suelo de rizósfera (Figura 8) donde se observa con menor intensidad la presencia de pristano y fitano, y únicamente en el cromatograma de la extracción por Soxhlet.

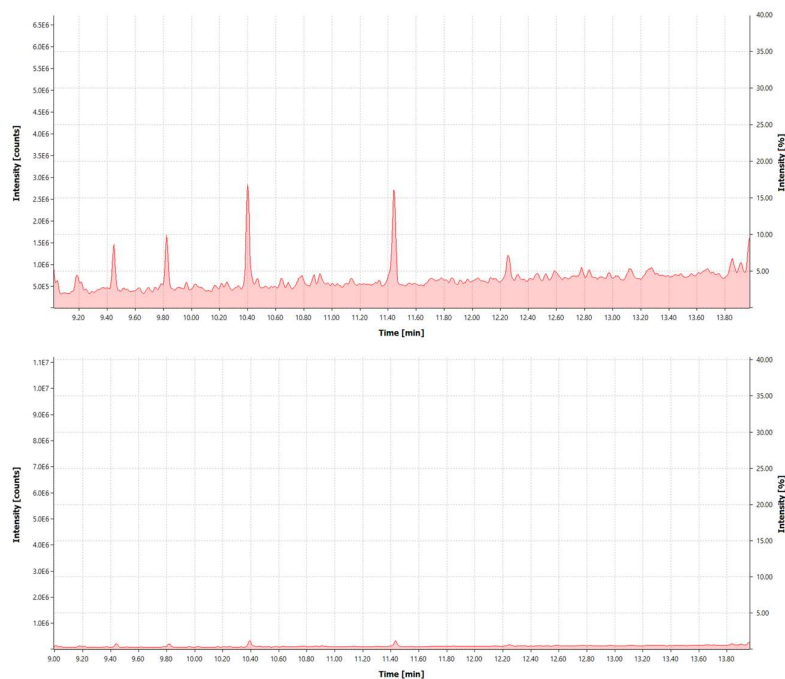


Figura 7. Cromatogramas de la muestra C – profundidad (C1P2) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior). Se muestra solamente la sección donde eluyen los compuestos de interés.

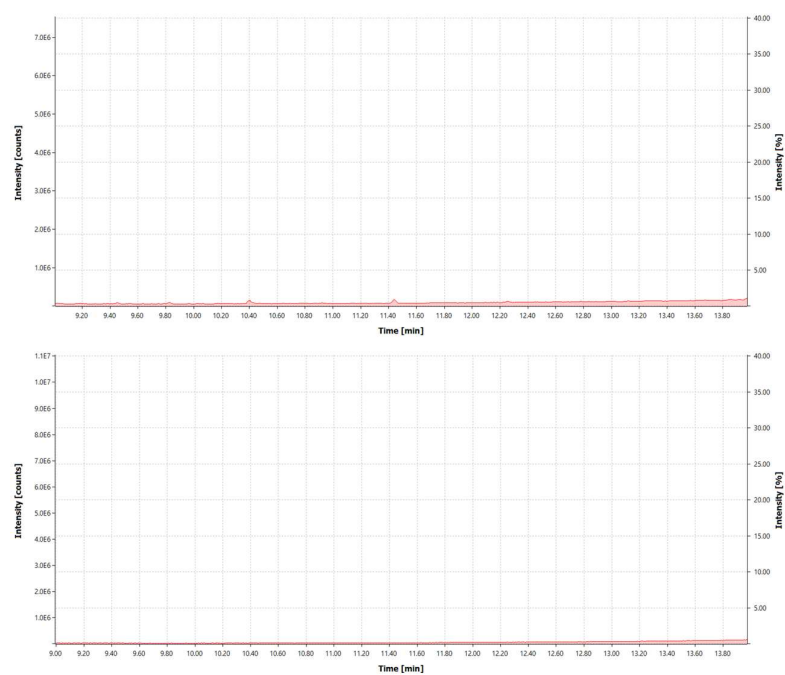


Figura 8. Cromatogramas de la muestra C - rizósfera (C1R2) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior). Se muestra solamente la sección donde eluyen los compuestos de interés.

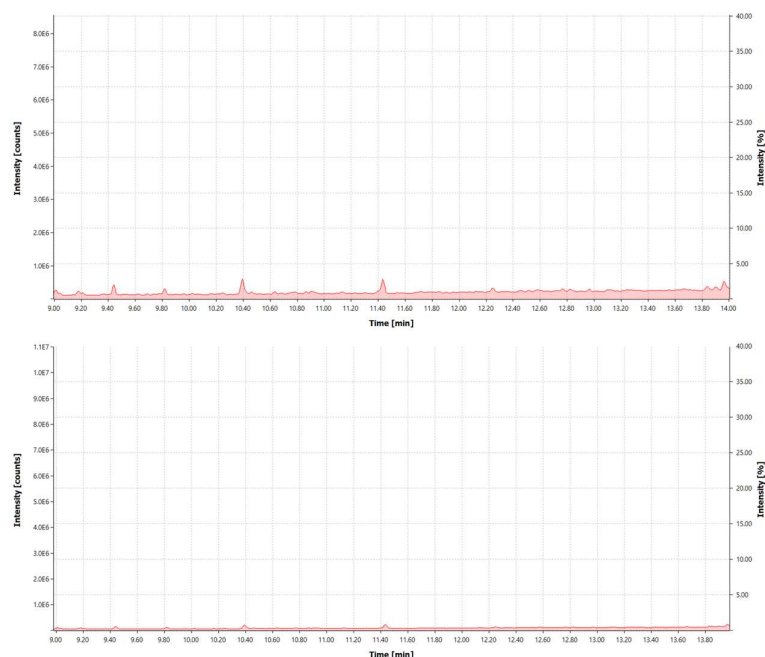


Figura 9. Cromatogramas de la muestra A – profundidad (A1P2) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior). Se muestra solamente la sección donde eluyen los compuestos de interés.

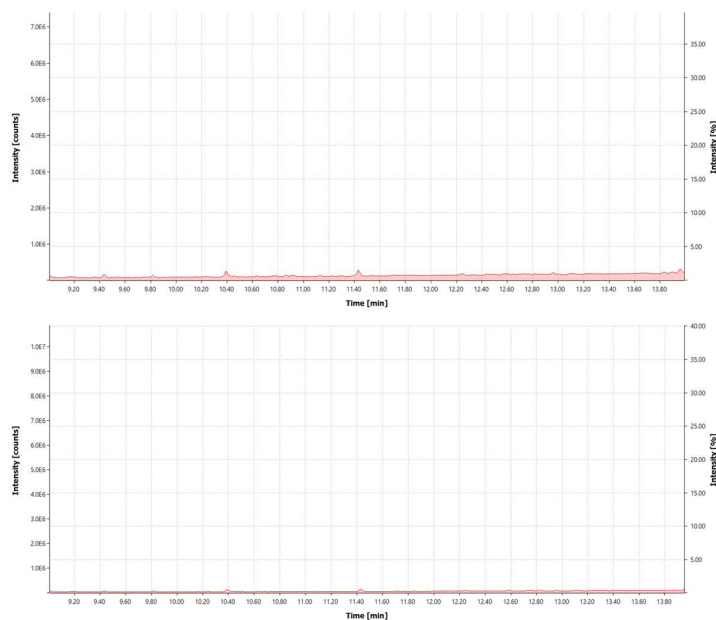


Figura 10. Cromatogramas de la muestra A – rizósfera (A1R2) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior). Se muestra solamente la sección donde eluyen los compuestos de interés.

Las muestras tomadas en el punto A muestran una variabilidad similar a las tomadas en el punto C, la intensidad de los picos que se observan en los cromatogramas de las muestras extraídas por ultrasonido es baja en comparación a las muestras extraídas por micro-Soxhlet, esto se puede evidenciar en las Figuras 9 y 10, donde se comparan los cromatogramas de ambas extracciones. En este caso las muestras tomadas en rizósfera y a profundidad muestran la presencia de los biomarcadores pristano y fitano.

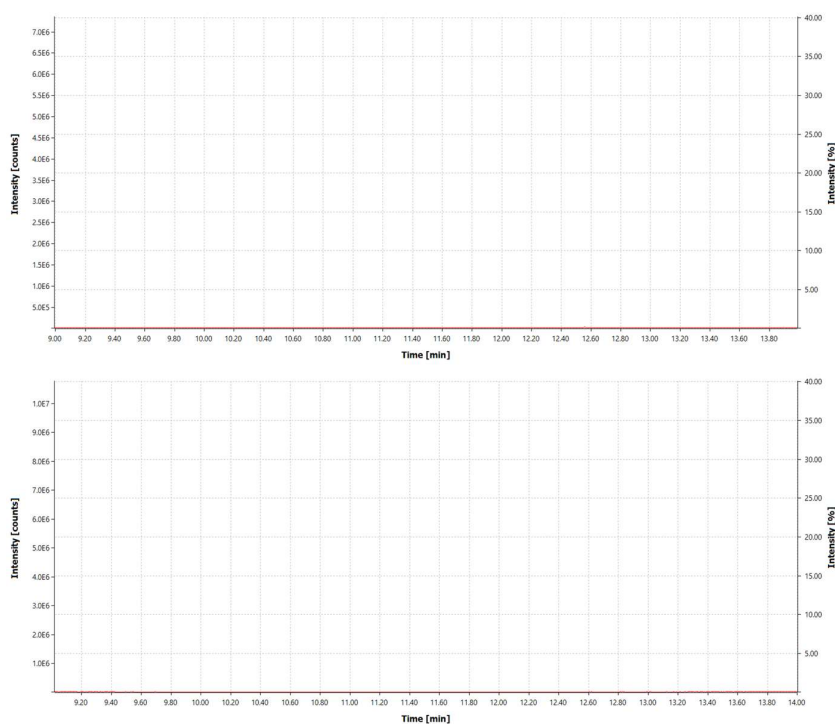


Figura 11. Cromatogramas de la muestra control (X2) extraída por Soxhlet (superior) y por Ultrasonido (inferior). Se muestra solamente la sección donde eluyen los compuestos de interés.

De acuerdo a los cromatogramas de los análisis de los blancos y muestra control extraídos por Soxhlet y por ultrasonido que se presentan en las Figuras 11 y 12, se observa que en el tiempo estimado donde aparecen los analitos de interés no hay presencia de ningún compuesto, lo que permite corroborar que las extracciones mediante Soxhlet y por ultrasonido se realizaron de forma correcta y que, tanto los solventes como el material estuvieron sin contaminación

alguna que pueda alterar los resultados. Así mismo, este resultado demuestra que fuera de la parcela de estudio (Figura 1, punto X) no existe presencia de hidrocarburos provenientes de la contaminación con crudo.

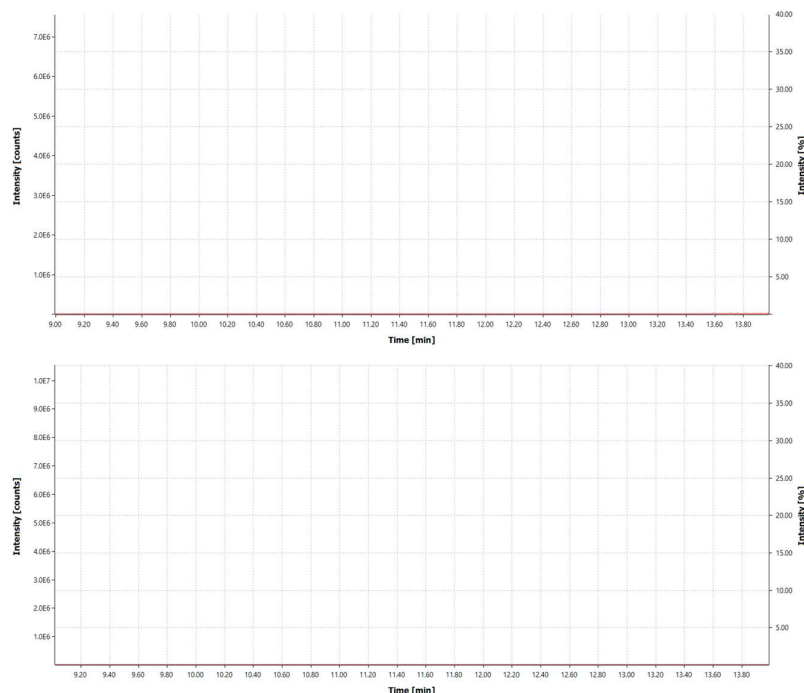


Figura 12. Cromatogramas de la muestra blanco (solvente) extraída por Soxhlet (superior) y por ultrasonido (inferior). Se muestra solamente la sección donde eluyen los compuestos de interés.

Teniendo en cuenta la información obtenida desde los cromatogramas y de los cálculos de la determinación del total de materia extraída con solvente (Tabla 4), se observa nuevamente una efectividad mayor en extracción por el método Soxhlet, en comparación con el ultrasonido. Si bien, en cuanto al porcentaje de material extraíble, no se puede desacreditar la efectividad de la extracción por ultrasonido, ya que las pruebas estadísticas así lo demuestran, al considerar la extracción de los compuestos de interés se obtiene claramente una mejor respuesta en la extracción por Soxhlet, ya que se observan los picos con mayor frecuencia y éstos tienen un área mayor.

Cuando se trata de analizar una mezcla compleja, como es el crudo, se requiere de una identificación confirmatoria mediante la obtención de la huella digital o espectral, del compuesto. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas nos brinda información complementaria ya que por un lado tenemos el tiempo de retención determinado por los cromatogramas de los compuestos y, adicionalmente, los espectros de masas de cada uno de los analitos de interés (Stashenko & Martínez, 2009). Tomando en cuenta los resultados descritos anteriormente, se puede decir que esta técnica fue adecuada para la separación e identificación de los compuestos de interés. No obstante, a pesar de haber trabajado con una técnica con gran sensibilidad, se requiere optimizar la identificación de biomarcadores mediante el uso de técnicas más especializadas junto con un correcto tratamiento de las muestras. Como se observa en los cromatogramas de las Figuras 6 y 8, hay muestras donde los picos se ven pequeños y no se permite determinar correctamente la presencia o ausencia de los compuestos. En este caso podemos considerar la cantidad de muestra utilizada como un factor limitante dentro del análisis, ya que una mayor cantidad de suelo habría implicado también una mayor cantidad de analito extraído; sin embargo, este parámetro no fue considerado inicialmente como un factor a optimizar ya que la bibliografía de referencia reportó resultados adecuados con cantidades similares de matriz (Wang, 2006). Otro factor para mejorar sería el tratamiento posterior a la extracción, donde se sugieren etapas de separación con columnas de sílica para la limpieza (*cleanup*) del extracto previo a su análisis por GC-MS (Wang, 2006 y Kao et al., 2019).

Una adecuada separación de los hidrocarburos presentes en las muestras permitiría también analizar el perfil de estos compuestos y, con ello, tener una visión general de los procesos de degradación. En el estudio de Chaillan et al. (2006) se menciona que, en suelos contaminados con crudo y tratados con procesos de biorremediación, los hidrocarburos saturados, incluidos lineales, ramificados y cicloalcanos, alcanzaron una degradación de hasta un 80% en condiciones ambientales (clima tropical) al cabo de 12 meses. Los alcanos lineales no se eliminaron por completo, aunque suponen ser totalmente biodegradables en los suelos; los hidrocarburos aromáticos en cambio se

degradaron en menor cantidad que los saturados, mientras que la fracción de asfaltenos fue parcialmente asimiladas. El orden de degradación fue lineal>ramificado>isoprenoides>mezcla compleja no resuelta. Por otra parte, Colombo et al. (1996) evaluaron durante 90 días la biodegradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos por la microflora natural del suelo, y comparó la efectividad de varias especies de hongos, adaptados y no adaptados a la contaminación; los resultados mostraron un carácter más recalcitrante de los hidrocarburos aromáticos en relación con los alifáticos, ya que estos últimos degradaron fácilmente y la reducción más importante, del 35 al 70%, ocurrió durante los primeros 15 días, opuesto a lo observado para la fracción aromática donde las eficiencias máximas de degradación se alcanzaron al finalizar los 90 días. Los análisis realizados permitieron dilucidar una clara tendencia de reactividad de los componentes del crudo durante la biodegradación, concordante con Chaillan et al. (2005): n-alcanos de menor peso molecular > fenantreno > 3-2-metilfenantrenos > n-alcanos de longitud de cadena intermedia > n-alcanos de longitud de cadena más larga > isoprenoides > 9-1-metilfenantrenos.

Es destacable que ambos estudios señalen la degradabilidad de los hidrocarburos de naturaleza isoprenoide, como son el pristano y el fitano. De acuerdo con nuestros resultados, hay zonas en el área de estudio donde estos compuestos no lograron ser identificados, bien por una limitación metodológica, expuesta anteriormente, o por la inexistencia de estos analitos debido a una extensiva degradación en dichos puntos. Como se observa en la Figura 4, las muestras de la rizosfera tienen menos presencia de biomarcadores que las muestras tomadas a profundidad, indicando que a medida que pasa el tiempo, las proporciones de dichos analitos disminuyen de manera considerable, es decir que eventualmente los biomarcadores se van degradando hasta desaparecer. Las muestras en el punto E1 a profundidad, por ejemplo, fueron las únicas en las que se logró identificar C₁₇, C₁₈, pristano y fitano; tomándolas como una línea base este punto, en comparación con las muestras del punto E1 en la rizosfera, se puede observar que ya no hay rastros de los analitos, indicando que en la

superficie existe una degradación mayor que podría atribuirse a la existencia de microorganismos.

El enfoque y alcance de este estudio no se inclina a determinar la presencia de microorganismos que se encuentren remediando el suelo, pero se los considera como el agente principal debido a la falta de interacción humana o animal en la zona. Los resultados presentados evidencian que el tiempo ha generado cambios en el suelo, ya que la superficie de Campo Charapas presenta una zona llena de vegetación y los resultados del análisis cromatográfico denotan procesos de transformación de los hidrocarburos a nivel de rizosfera, donde existe un microbioma que facilita, justamente, la existencia de plantas. Por otra parte, los resultados obtenidos podrían hacer referencia a una degradación más compleja, que involucra fotooxidación superficial, y no solamente biodegradación. Bacosa et al. (2015) mencionan que la luz solar inhibe la biotransformación de pristano y fitano, posiblemente por la inhibición de las bacterias que pueden degradar a los alcanos ramificados y/o a los efectos de toxicidad de los metabolitos de fotooxidación. Su estudio proporciona medidas cuantitativas de la degradación del petróleo disperso en agua marina con diversas condiciones de exposición a luz solar y postula que la interpretación de los *ratios* que incluyen a estos biomarcadores debe realizarse con cautela, evitando comparar sustratos que difieren en su irradiación.

Otra consideración al interpretar la degradación de hidrocarburos es el efecto de otros nutrientes que se encuentran en el suelo. Por ejemplo, en el artículo de Chaillan et al. (2006) al transferir los suelos a condiciones controladas altamente aeróbicas aumentó el grado de biodegradación, pero aun así existían compuestos degradables que no se habían eliminado por completo; esto condujo a una serie de experimentos que demostraron que las concentraciones excesivas de nutrientes pueden llegar a inhibir la actividad biodegradadora. Se ha demostrado que los nutrientes tienen gran importancia en los procesos microbianos: el nitrógeno (N) es necesario para la síntesis de proteínas y el fósforo (P) participa en el transporte de energía. Los suelos contaminados que

tienen niveles intrínsecamente bajos de N y P requerirán adiciones de nutrientes para permitir un aumento suficiente en la biomasa para que ocurra una degradación de hidrocarburos significativa en la zona (Ferguson et al., 2003). Existen casos en los que los niveles de nutrientes ya son adecuados para la biodegradación y aun así, se realizan enmiendas de nutrientes, otorgando un efecto significativamente negativo en la tasa de remediación, como lo demuestran los artículos de Chaillan et al. (2006) y Ferguson et al. (2003). Así mismo, Walworth et al. (1997) encontraron que la biodegradación se puede inhibir mediante la adición de nutrientes debido a la íntima relación entre las concentraciones de nutrientes y el agua en la matriz del suelo; existe un punto en que los nutrientes se vuelven tóxicos para la microbiota de suelos a altos potenciales osmóticos, por lo que es importante no solo mantener suficientes micronutrientes, sino también garantizar que la humedad sea la adecuada de acuerdo al tipo de suelo en cuestión, considerando su capacidad de retención de agua. Es igualmente relevante el estudio de Dawson et al. (2013), quienes apuntan a la degradación anaeróbica de pristano y fitano asociada a la reducción de ion nitrato, es decir que, la presencia de este ion facilitó la biotransformación de ambos biomarcadores.

La identificación de compuestos biomarcadores de degradación es una técnica muy versátil y útil para revelar presencia de contaminación en una zona o también para dar seguimiento a una remediación. En trabajos donde se habla de sedimentos con materia orgánica inmadura, la relación Pristano/Fitano se ha convertido en un indicador común para diferenciar entre los niveles de oxígeno (Powell et al., 1988). Se debe tener muy en cuenta los precursores del pristano y fitano ya que, su preservación selectiva será diferente en cada ambiente sedimentario. Los objetivos principales de este trabajo no buscaban determinar cuantitativamente dicho *ratio*, pero esta explicación permite demostrar su utilidad como indicador de degradación; la presencia de pristano y fitano es fundamental en este análisis debido a que se presentan como los biomarcadores más utilizados para determinar la etapa degradativa de una zona contaminada o verificar la presencia o ausencia de un proceso de remediación y degradación. Estudios más recientes apuntan a diversificar los biomarcadores empleados con

esta finalidad. Kao et al. (2019) sugiere incluir a los adamantanos como compuestos diagnósticos de fuentes antropogénicas de hidrocarburos y brinda una detallada metodología analítica para varias matrices ambientales.

5.5 GRADO DE WEATHERING

Tomando en cuenta las publicaciones de Wang (1995, 2006), en las que presenta información sobre la identificación de C_{30} $\alpha\beta$ -hopano, se estimaba encontrar el biomarcador para el cálculo del grado de *weathering* en este estudio. Para su identificación del se recurrió al análisis del cromatograma de ion extraído (XIC, siglas en inglés) de la muestra E1P1, tomada anteriormente como referencia para los otros analitos. El XIC permite visualizar únicamente las sustancias que contienen una determinada relación masa-carga, con lo cual la presencia de dichos compuestos es más evidente en comparación al TIC (cromatograma de ion total, siglas en inglés). En este caso, se seleccionó la m/z 191 al ser el pico base del espectro de referencia del compuesto de interés (Figura 13).

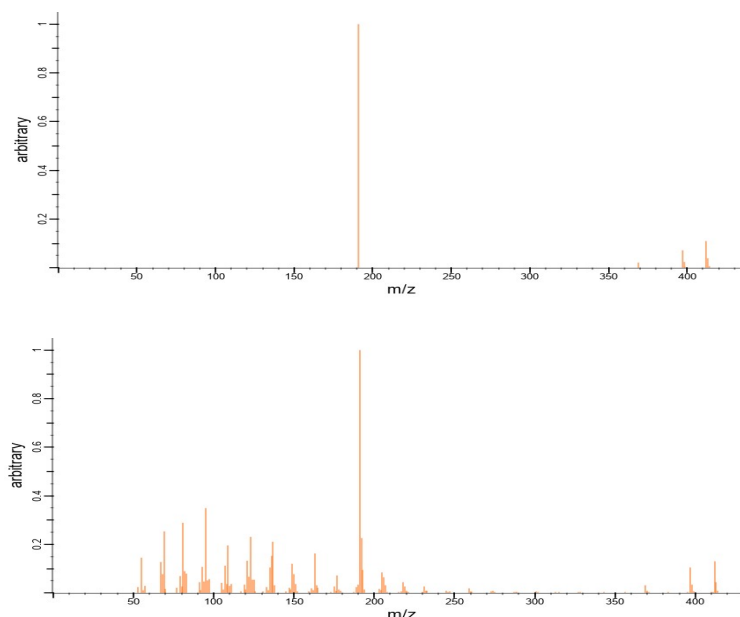


Figura 13. Espectros de masas de C_{30} $\alpha\beta$ -hopano (parte superior) y C_{30} $\alpha\alpha$ -hopano (parte inferior). Tomados de la biblioteca SpectraBase (John Wiley & Sons Ltd., 2021)

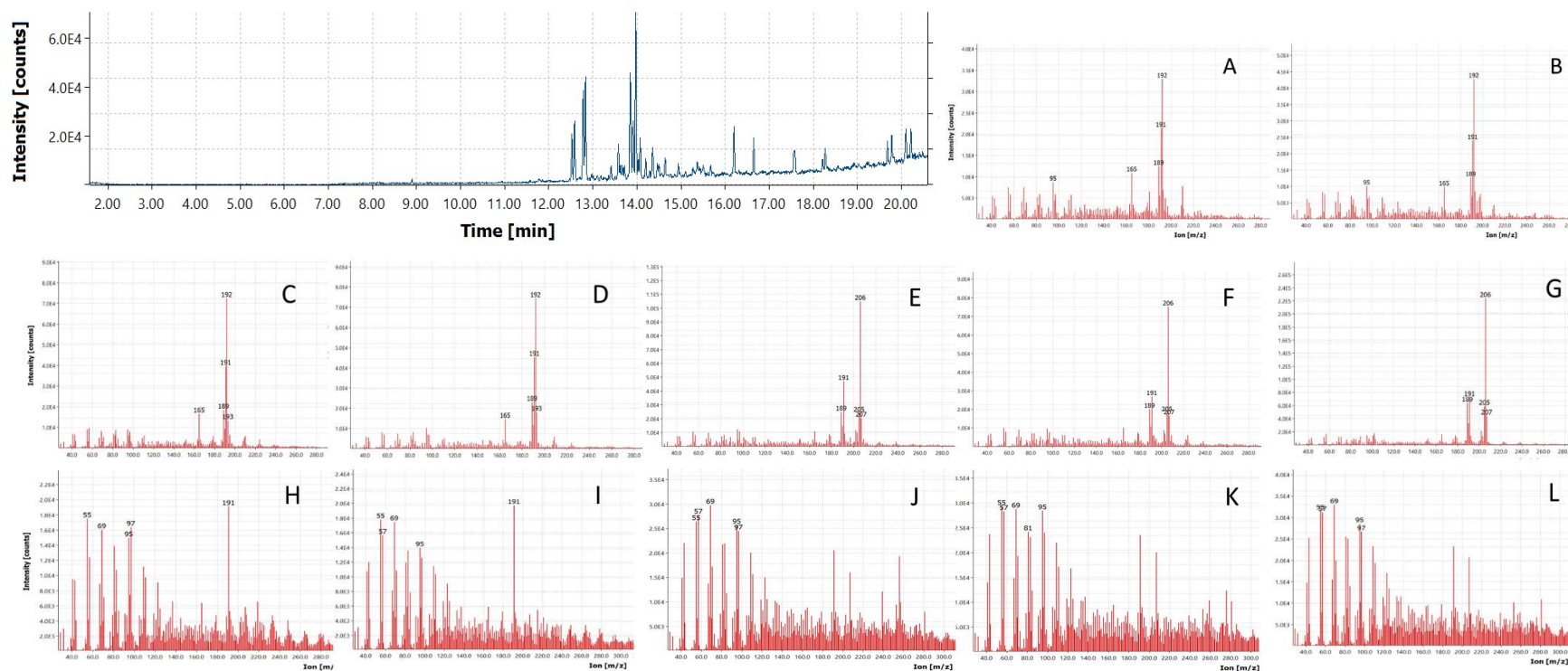


Figura 14. Cromatograma de ion extraído m/z 191 de la muestra E – profundidad (E1P) extraída por micro-Soxhlet en conjunto con los espectros de masas de los picos con mayor intensidad (> 10 000 cuentas). Espectro de los picos con tiempo de retención: (A) 12,53 minutos (B) 12,58 minutos (C) 12,78 minutos (D) 12,83 minutos (E) 13,85 minutos (F) 13,92 minutos (G) 13,97 minutos (H) 16,20 minutos (I) 16,65 minutos (J) 19,78 minutos (K) 20,10 minutos (L) 20,22 minutos

Es importante mencionar que, si bien existe una ligera discrepancia entre los iones de menor intensidad de los dos espectros de la Figura 13, al revisar otras publicaciones, en particular Hwang (1990), citada en la base de datos del NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos, siglas en inglés), este no es el caso, y ambos isómeros tienen espectros prácticamente idénticos.

Con la información de la Figura 14 no se logró identificar al C_{30} $\alpha\beta$ -hopano, ya que ninguno de los picos guardó alta similitud con aquel de referencia (Figura 13). Se revisaron también los espectros de los picos con intensidad menor a diez mil cuentas, sin encontrarse uno que sea satisfactorio (imágenes no mostradas). Posterior a esto, se revisaron los XIC de las otras muestras, y no se encontraron potenciales picos de interés fuera de aquellos ya revisados anteriormente. En la Figura 15 se puede visualizar la superposición de todos los XIC de las muestras extraídas por micro-Soxhlet, en las cuales se descarta la presencia de C_{30} $\alpha\beta$ -hopano.

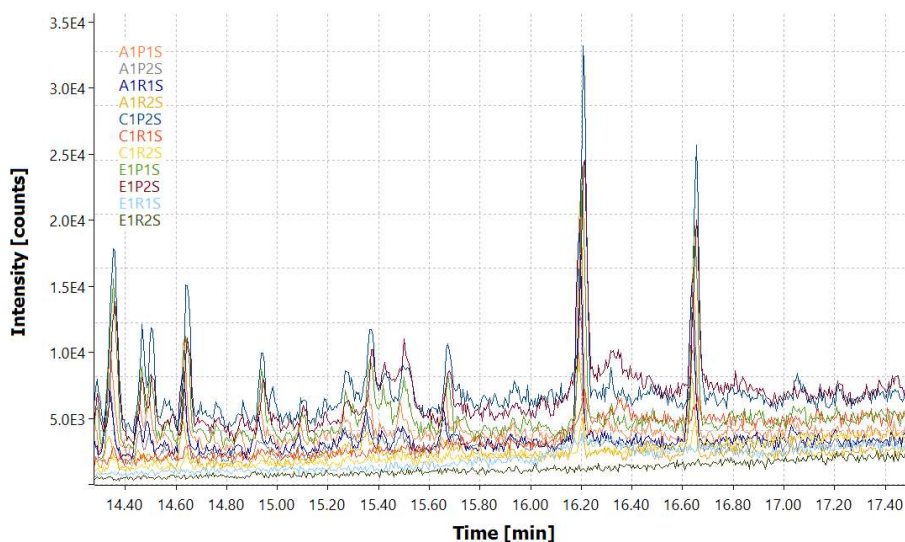


Figura 15. Cromatogramas de ion extraído m/z 191 de las muestras extraídas por micro-Soxhlet. La gráfica presenta un acercamiento de 14 a 17 minutos para una mejor apreciación. La leyenda permite identificar mediante clave de color el cromatograma que corresponde a cada muestra.

Al generar una imagen similar para las muestras extraídas por ultrasonido, se obtuvo la Figura 16, donde se observan picos en tiempos de retención diferentes a los obtenidos por extracción micro-Soxhlet. El pico de mayor intensidad se encontró en un tiempo de retención de 15,50 minutos y al obtener el espectro de masas en este punto del cromatograma, se observó una gran similitud con el espectro de referencia, por lo cual, se dedujo que podría tratarse del C₃₀ αβ-hopano.

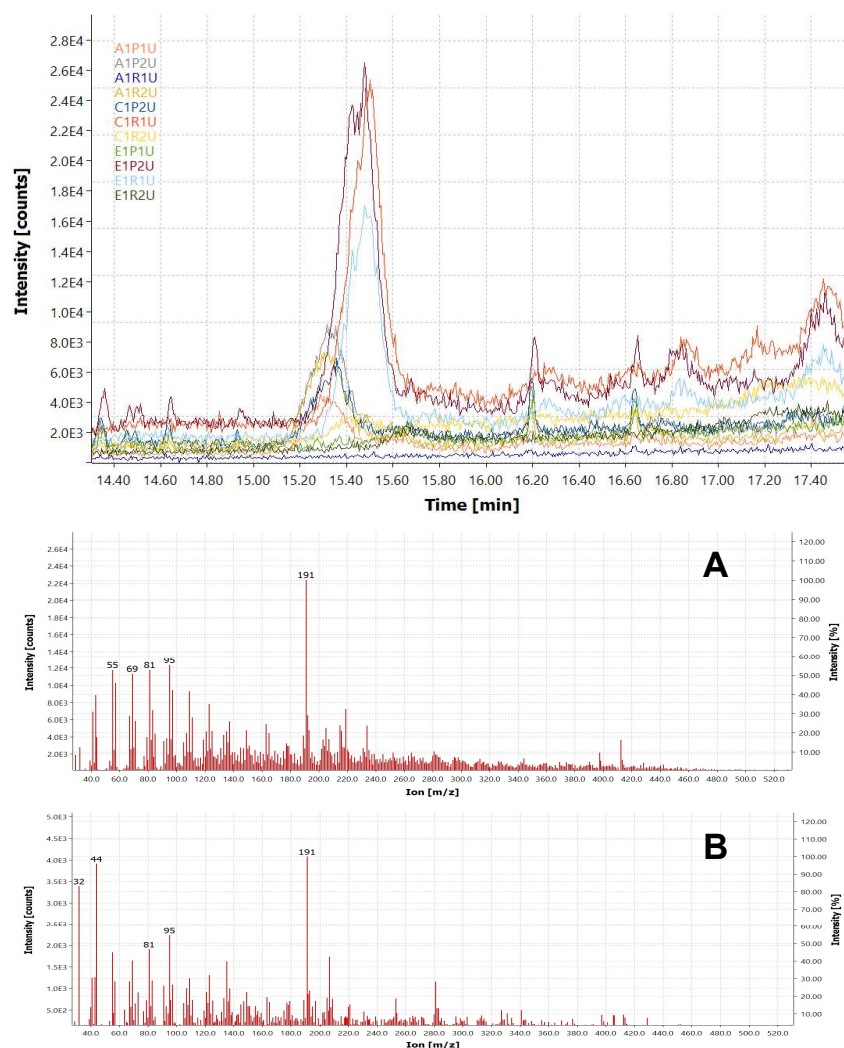


Figura 16. Cromatogramas de ion extraído m/z 191 de las muestras extraídas por ultrasonido en conjunto con los espectros de masas de los picos en (A) 15,50 y (B) 15,30 minutos. La gráfica presenta un acercamiento de 14 a 17 minutos, sección de interés. La leyenda permite identificar mediante clave de color el cromatograma que corresponde a cada muestra.

En la Figura 16 se observa que en un grupo de muestras hay la presencia del pico en 15,50 minutos; dentro de este grupo se encuentra la muestra C1R1, E1P2 Y E1R1, en las cuales hay coincidencia en los espectros de masa, por lo que se deduce que representan el mismo compuesto. Sin embargo, en ninguno de los duplicados de dichas muestras se logra identificar al mismo compuesto, por lo cual, se pone en duda la repetibilidad de la extracción para el C₃₀ αβ-hopano e imposibilita la estimación del grado de *weathering*. Por otro lado, las muestras A1P2, A1R1, A1P1 Y C1P2 forman un segundo grupo, en el cual se observa un pico a 15,30 minutos, cuyo espectro no es similar al del compuesto de interés, por lo que se descarta su coincidencia. Se revisaron también otros picos, sin encontrarse otros de potencial interés.

Con base en estos resultados, se puede hacer mención que para la identificación de C₃₀ αβ-hopano se requiere una mayor optimización del método analítico. En la Figura 16 se observa un espectro de masas con ruido apreciable, y un XIC con ruido también, indicando que las cantidades extraídas de compuesto son mínimas. Además, la ausencia del pico en las réplicas de las muestras es indicativa de un limitado desempeño analítico bajo las condiciones propuestas. Otro factor que debe considerarse a futuro es el uso de estándares, que en este caso no fue posible debido a las limitaciones logísticas ocasionadas por la crisis sanitaria causada por el SARS-CoV-2. Al no contar con estándares, la identificación de los compuestos es limitada, ya que se basa únicamente en su comparación a bibliografía y bibliotecas espectrales. El contar con estándares permitiría tener mayor certeza en el análisis cualitativo y, ayudaría a la estimación de los principales parámetros de desempeño del método, así como al cálculo del grado de *weathering*.

Hay estudios donde se aplica otro tipo de método para la determinación del *weathering*. McIntyre et al. (2007) proponen trazar la proporción de diastereoisómeros de pristano (PrDR) frente al ratio Pristano/Fitano (Pr/Ph), permitiendo determinar la extensión relativa de *weathering*. El PrDR se utiliza para tener en cuenta la biodegradación, ya que es independiente de la

evaporación. El método resulta ser sencillo e igual de robusto como las proporciones convencionales, no obstante, en nuestro caso, la falta de estándares evita que podamos intentar utilizar este método, ya que no se puede cuantificar los analitos y, por tanto, no se puede determinar el ratio Pr/Ph. Además, se debería optimizar el método cromatográfico para incluir la separación de diastereoisómeros de pristano.

Para este estudio se propuso seguir la metodología de análisis de Wang (2006) donde se habla de que componentes altamente resistentes a la degradación, como es el C30- $\alpha\beta$ -hopano, se los ha aplicado como “patrones internos” para lograr una estimación más precisa del grado de *weathering* y la extensión de petróleo derramado. Este compuesto suele ser el más abundante de entre los biomarcadores de C19 a C35, permitiendo cuantificar con mayor exactitud. Existen casos donde se puede subestimar el uso de este biomarcador como referencia, ya que los porcentajes de *weathering* pueden no ser certeros debido a que las muestras se encuentran extremadamente degradadas, esto se debe a que bajo ciertas circunstancias el C30- $\alpha\beta$ -hopano está parcialmente agotado.

El artículo de McIntyre et al. (2007) puntualiza que el enfoque del método aplicado se adapta al tipo de ensayo y a la naturaleza de las muestras, ya que la fuente de contaminación fue uniforme, con un gran número de muestras modificadas y controles muestreados después de un período de tiempo prolongado. Sin embargo, puede que este método no sea aplicable a muestras que tengan diferentes fuentes de contaminación; tampoco se podría utilizar de forma fiable como un marcador para muestras moderadamente degradadas, como resultado de efectos tanto de la evaporación como de la degradación.

Con ayuda de un método analítico apropiado se podría mapear la extensión de los contornos de evaporación en una parcela, de modo que se pudiera estimar varios niveles de *weathering*. Los estudios sobre este parámetro

en campo Charapas se pueden seguir manejando, pero como primer punto, convendría determinar una línea base del crudo que se encuentra allí, en las capas más profundas, bajo el suelo contaminado que fue objeto de este estudio, con el fin de conocer su composición y perfil de isoprenoides.

6. CONCLUSIONES

1. Este estudio permitió identificar la presencia de pristano, fitano, n-heptadecano y n-octadecano como los biomarcadores presentes en una zona contaminada con crudo en campo Charapas, provincia de Sucumbíos - Ecuador mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El análisis cromatográfico se vio acompañado de una comparación entre una extracción por micro-Soxhlet y por ultrasonido, que demostró la influencia de la técnica de extracción tanto en el porcentaje de material extraíble como en la recuperación de los biomarcadores de interés. La identificación de estos compuestos sugiere que existen procesos de degradación que se logran evidenciar por la diferencia en la composición de las muestras que fueron tomadas a profundidad y en rizósfera. Sin embargo, no se logró diferenciar la degradación biológica de la física (weathering), al no encontrarse la presencia del biomarcador C_{30} $\alpha\beta$ -hopano.
2. En cuanto al método de extracción, se determinó que el método más eficiente para la identificación de los biomarcadores pristano, fitano, n-heptadecano C_{17} y n-octadecano C_{18} en el suelo contaminado, fue la extracción por micro-Soxhlet. Este método mostró mayor número de biomarcadores en un mayor número de muestras, contrario a la extracción asistida por ultrasonido, que, si bien logró una recuperación de material extraíble total comparable a Soxhlet, no logró mostrar presencia de los analitos de interés.
3. La identificación de pristano, fitano, C_{17} y C_{18} como biomarcadores asociados a los procesos de biodegradación en las muestras tomadas del suelo en el campo Charapas, se realizó satisfactoriamente mediante GC-MS y con tratamiento de datos en el programa OpenChrom a través de la comparación de los espectros de masas obtenidos con los de bases de datos de referencia. En todos los casos se obtuvieron espectros con alta similitud.

4. Por último, el grado de *weathering* del estanque de petróleo de Campo Charapas no se pudo calcular debido a que el marcador C₃₀ αβ-hopano no logró ser identificado con total certeza con las metodologías aplicadas. El análisis de este compuesto requiere una optimización más especializada del método analítico.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abasolo, F. & Morante, L. (2019). *Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos*. Quevedo: Colloquium: Primera edición. ISBN: 978-9942-814-33-3
- Adams, R. H.; Zavala-Cruz, J. & Morales-García, F. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. I: Consideraciones para la salud pública y protección al ganado. *Interciencia*, 33(7), 476–482.
- Allan, K.A., Herbert, B.E., Morris, P.J., Mc. Donald, T.J. (1997). Biodegradation of petroleum in two soils: implications for hydrocarbon bioavailability. *In Situ On-Site Bioremediat.* 5, 629–634.
- Arias, P. (2011). *Extracción de grasas por micro Soxhlet frente a la técnica convencional macro Soxhlet en productos alimenticios de mayor consumo en la ciudad de Quito* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2011). Standard Format and Guidance for AOAC Standard Method Performance Requirement (SMPR) Documents. *AOAC*, 12(1), 1–27.
- Bacosa, H. P., Erdner, D. L., & Liu, Z. (2015). Differentiating the roles of photooxidation and biodegradation in the weathering of Light Louisiana Sweet crude oil in surface water from the Deepwater Horizon site. *Marine Pollution Bulletin*, 95(1), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.005>
- Bozo, L., et al (2007). Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. *INCI*. vol.32, n.1, pp. 8-13. ISSN 0378-1844.
- Bragg, J.R.; Prince, R.C.; Harner, E.J. y Atlas, R.M. (1994). Effectiveness of bioremediation from the Exxon Valdez oil spill. *Nature* 368, 413-418.
- Bravo, E. (2007). Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. *Acción Ecológica*, INREDH: Colombia.

- Cando, M. (2011). *Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos* (Disertación de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.
- Chaillan, F., Chaîneau, C. H., Point, V., Saliot, A., & Oudot, J. (2006). Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. *Environmental Pollution*, 144(1), 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.016>
- Cho, Y., Rhee, S., & Lee, S. (2000). Effect of Soil Moisture on Development. *Florida Entomologist*, 3, 915–919.
- Colombo, J. C., Cabello, M., & Arambarri, A. M. (1996). Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure culture of imperfect and lignolitic fungi. *Environmental Pollution*, 94(3), 355–362. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00044-9)
- Correa, C. (1996). Marcadores biológicos, extracción y usos. *Revista Universidad EAFIT*, No. 101, 97-108
- Cuvi, N.; Bejarano, M. (2015). Los halos de inhibición en la remediación de suelos amazónicos contaminados con petróleo. *História, Ciências, Saúde*, v.22, 1693-1714.
- Damaison, G. & Huizinga, B. (1991). Genetic classification of petroleum system. *AAPG Bulletin*, Vol 75 n 10. Oct, 1626-1643.
- Datta, S., Taghvaeian, S., & Stivers, J. (2017). *Understanding Soil Water Content and Thresholds for Irrigation Management*. Oklahoma Cooperative Extension Service, BAE-1537.
- Dawson, K. S., Schaperdoth, I., Freeman, K. H., & Macalady, J. L. (2013). Anaerobic biodegradation of the isoprenoid biomarkers pristane and phytane. *Organic Geochemistry*, 65, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2013.10.010>
- Ferguson, S. H., Franzmann, P. D., Revill, A. T., Snape, I., & Rayner, J. L. (2003). The effects of nitrogen and water on mineralisation of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. *Cold Regions Science and*

- Technology*, 37(2), 197–212. [https://doi.org/10.1016/S0165-232X\(03\)00041-7](https://doi.org/10.1016/S0165-232X(03)00041-7)
- Fingas, M. F. (1995). A literature review of the physics and predictive modelling of oil spill evaporation. *Journal of Hazardous Materials*, 42(2), 157–175. doi:10.1016/0304-3894(95)00013-k
- Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*, 122, 35–41.
- Haghollahi, A., Fazaelipour, M. H., & Schaffie, M. (2016). The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils. *Journal of Environmental Management*, 180, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.038>
- Han, Y., John, G. F., & Clement, T. P. (2019). Understanding the thermal degradation patterns of hopane biomarker compounds present in crude oil. *Science of the Total Environment*, 667, 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.445>
- Hernández, M.; Morales-Bautista, C.; Olán, C. & Adams, R. (2016). Extracción de Hidrocarburo Pesado en Suelo Acrisol. *Journal of Basic Sciences*. 2(5), 18–23.
- Hwang, R. J. (1990). Biomarker Analysis Using GC-MSD. *Journal of Chromatographic Science*, 28(3), 109–113. doi:10.1093/chromsci/28.3.109
- John Wiley & Sons, Inc. (n.d.). 17 $\alpha(H)$, 21 $\alpha(H)$ - HOPANE and 17 $\alpha(H)$, 21 $\beta(H)$ -HOPANE. SpectraBase. Retrieved October 27, 2021, from <https://spectrabase.com/spectrum/osVTBBSJ6e>
- Kao, N. H., Su, M. C., Yen, C. C., & Huang, Y. J. (2019). A characterization of the soils and sediments in contaminated sites and rivers using petroleum biomarker compounds. *Journal of Soils and Sediments*, 19(1), 241–254. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2033-0>

- Kenig, F., Simons, D. J. H., Crich, D., Cowen, J. P., Ventura, G. T., & Rehbein-Khalily, T. (2005). Structure and distribution of branched aliphatic alkanes with quaternary carbon atoms in Cenomanian and Turonian black shales of Pasquia Hills (Saskatchewan, Canada). *Organic Geochemistry*, 36(1), 117–138. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.06.014>
- Kramarenko, V. V., Nikitenkov, A. N., Matveenkov, I. A., Molokov, V. Y., & Vasilenko, Y. S. (2016). Determination of water content in clay and organic soil using microwave oven. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 43(1), 6–12. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/43/1/012029>
- Little, T. A. (2016). Establishing Acceptance Criteria for Analytical Methods. *BioPharm International, Analytical Best Practices*, 2–6.
- Marín, F. (2018). *Biodegradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo por Hongos Endófitos de la Amazonía Ecuatoriana* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Martínez-Chávez, C.; Morales-Bautista, C. & Alor-Chávez, M. (2017). Extracción De Hidrocarburo Pesado En Suelo Arenoso. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 8(1), 9–16.
- McIntyre, C. P., Harvey, P. M. A., Ferguson, S., Wressnig, A. M., Snape, I., & George, S. C. (2007). Determining the extent of weathering of spilled fuel in contaminated soil using the diastereomers of pristane and phytane. *Organic Geochemistry*, 38(12), 2131–2134. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2007.07.010>
- Mogrovejo, M. (2019). *Degradación de hidrocarburos con hongos micorrízicos arbusculares Rhizophagus irregularis y una cepa nativa proveniente de la Amazonía Ecuatoriana asociados a pasto RyeGrass (Lolium multiflorum)* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

- Mueller, J.G.; Resnick, S.M.; Shelton, M.E. y Pritchard, P.H. (1992). Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe Bay crude oil. *Journal of Industrial Microbiology*, 10, 95–102.
- Ortiz, J. E., García, M. J., & Rodríguez Gallego, J. L. (2003). Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo. *Industria y Minería*, 351, 41–45.
- Pacheco, M. (29 de julio de 2019). *Bacterias nativas comen el petróleo y remedian suelos contaminados en Ecuador*. Diario El Comercio. Recuperado de: <https://www.elcomercio.com/tendencias/bacterias-petroleo-contaminacion-suelos-ecuador.html>
- Pelaez, J.; Vaccaro, G.; Yanez, E.; Saqalli, M. (2016). Sistemas para Detección de Contaminación por Hidrocarburos: Aplicación al Oriente Ecuatoriano. *RISCI: Revista Iberoamericana de Sistemas, Cibernética e Informática*, 180-185. <https://hal-univ-tlse2.archives-ouvertes.fr/hal-01683552>
- Pérez, R., Camacho, M., Gomez, J., & Cantero, D. (2008). Aislamiento Y Selección De Una Cepa Bacteriana. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39(1), 9. <https://www.redalyc.org/html/1812/181214889004/>
- Pons-Jiménez, M.; Guerrero-Peña, A.; Zavala-Cruz, J. & Alarcón A. (2011). Extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo en suelos con características físicas y químicas diferentes. *Universidad y Ciencia*, 27(1), 1–15.
- Powell, T., Ten Haven, H., Rullkötter, J. (1988). Pristane/phytane ratio as environmental indicator. *Nature*, 333, 604.
- Prinik, M.P.; Atlas, R.M. y Bartha, R. (1977). Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *Journal of Bacteriology* 119, 868-878.
- Ries-Kautt, M., & Albrecht, P. (1989). Hopane-derived triterpenoids in soils. *Chemical Geology*, 76(1-2), 143–151. doi:10.1016/0009-2541(89)90133-2
- Reyes, C., Moreira, I., Oliveira, D., Medeiros, N., Almeida, M., Wandega, F., Soares, S., & Oliveira, O. (2014). Weathering of Petroleum Biomarkers:

- Review in Tropical Marine Environment Impacts. *Open Access Library Journal*, 01(09), 1–13. <https://doi.org/10.4236/oalib.1101004>
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2009). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*, 1(3), 31–49. www.scientiachromatographica.com
- Stroud, A.; Paton, G. & Semple, K. (2007). Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. *Journal of Applied Microbiology* 102, ISSN 1364-5072, 1239-1253.
- Topp, G.; Parkin, G. & Ferré, P. (1993). Soil water content. In Carter, M., Gregorich, E (Eds). *Soil Sampling and Methods of Analysis* (pp. 939-962). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Trindade, P. V. O., Sobral, L. G., Rizzo, A. C. L., Leite, S. G. F., & Soriano, A. U. (2005). Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: A comparison study. *Chemosphere*, 58(4), 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.021>
- US EPA (1996). Method 3540C Soxhlet extraction organics. EPA, Washington, Virginia, USA: *Environmental Protection Agency of United States of América*, 1-8.
- Viera, O., Fernández, S. (2020). Comparación de los métodos de extracción para hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos marinos empleando Soxhlet y baño ultrasónico. *Revista Centro Azúcar* 47. ISSN 2223-4861
- Walworth, J. L., Woolard, C. R., Braddock, J. F., & Reynolds, C. M. (1997). Enhancement and inhibition of soil petroleum biodegradation through the use of fertilizer nitrogen: An approach to determining optimum levels. *Soil and Sediment Contamination*, 6(5), 465–480. <https://doi.org/10.1080/15320389709383580>
- Walworth, J., Pond, A., Snape, I., Rayner, J., & Ferguson, S., Harvey, P. (2005). Fine tuning Soil Nitrogen to Maximize Petroleum Bioremediation. In *ARCSACC 2005, Proceedings of the 2005 Conference on Assessment*

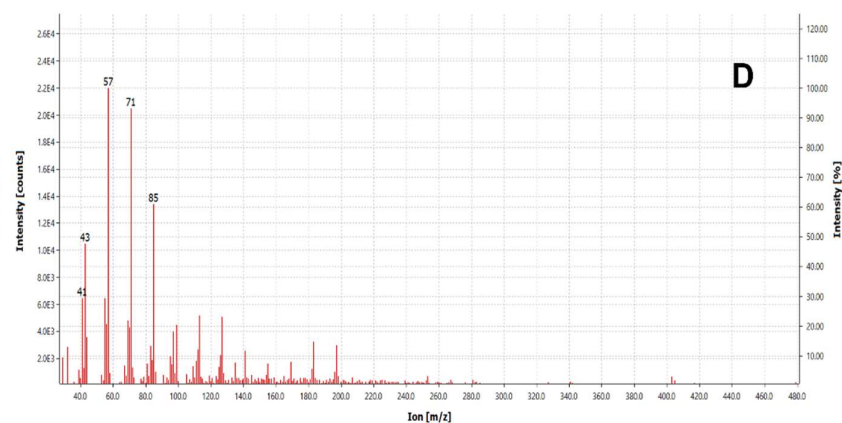
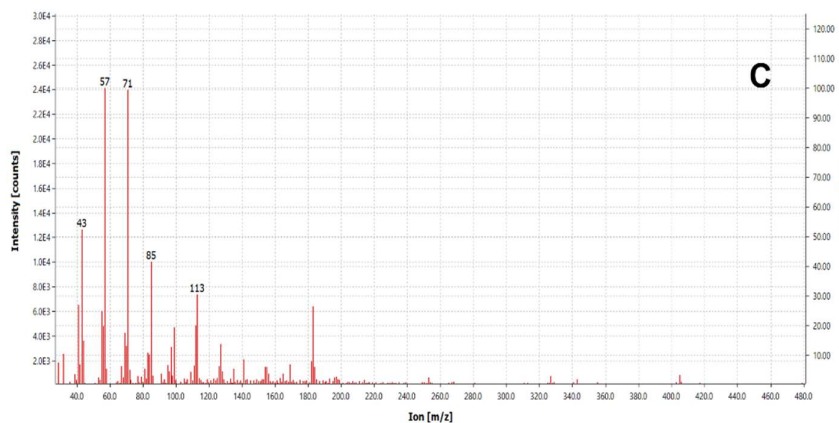
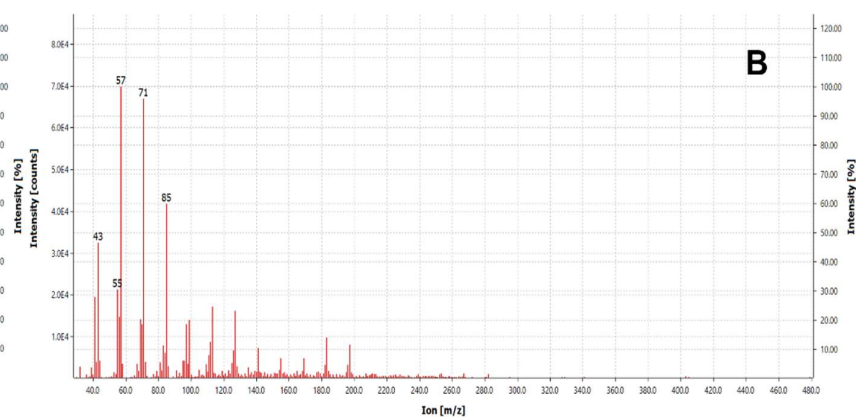
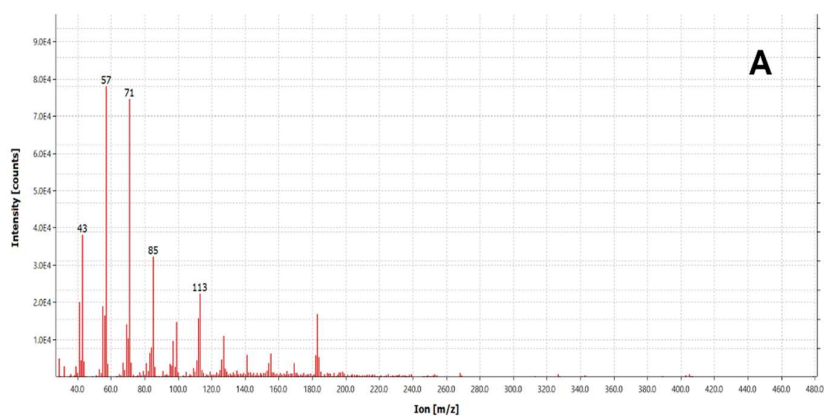
and Remediation of Contaminated Sites in Arctic and Cold Climates (pp. 251–255).

- Wang, Z., Fingas, M., Owens, E., Sigouin, L., & Brown, C. (2001). Long-term fate and persistence of the spilled Metula oil in a marine salt marsh environment: degradation of petroleum biomarkers. *Journal Chromatography*, 926, 275–190.
- Wang, Z.; Stout, S. & Fingas, M. (2006). Forensic Fingerprinting of Biomarkers for Oil Spill Characterization and Source Identification. *Environmental Forensics*. 7(2), 105-146. DOI: 10.1080/15275920600667104
- Wang, Z., & Fingas, M. (1995). Study of the effects of weathering on the chemical composition of a light crude oil using GC/MS GC/FID. *Journal of Microcolumn Separations*, 7(6), 617–639. <https://doi.org/10.1002/mcs.1220070609>
- Wang, C., Chen, B., Zhang, B., He, S., & Zhao, M. (2013). Fingerprint and weathering characteristics of crude oils after Dalian oil spill, China. *Marine Pollution Bulletin*, 71(1–2), 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.03.034>
- Wolicka, D. & Borkowski, A. (2012). Microorganisms and crude oil. In L. Romero-Zerón (Ed.), *Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites* (pp. 113–142). Intechopen. <https://doi.org/10.5772/2053>
- Zahermand, S., Vafaeian, M., & Bazayr, M. H. (2020). Analysis of the physical and chemical properties of soil contaminated with oil (Petroleum) hydrocarbons. *Earth Sciences Research Journal*, 24(2), 161–166. <https://doi.org/10.15446/esrj.v24n2.76217>

8. ANEXOS

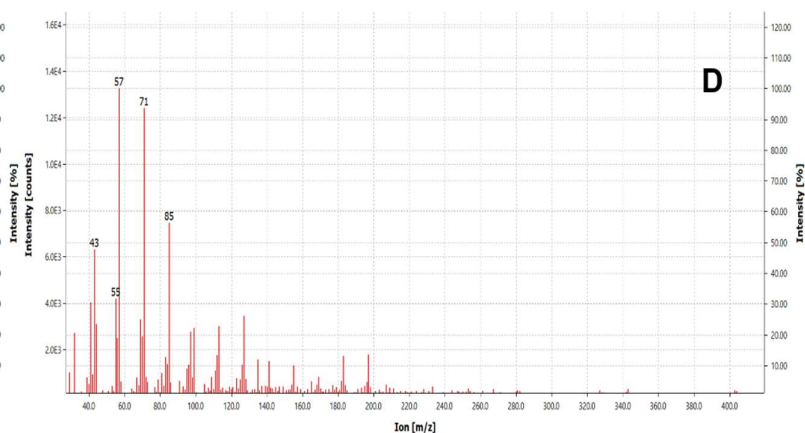
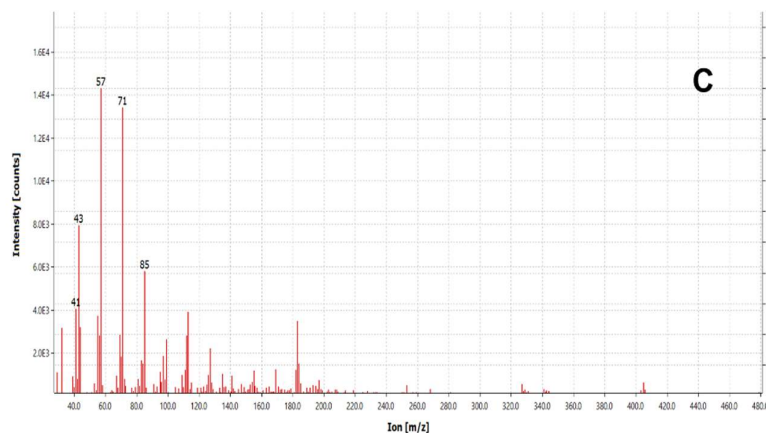
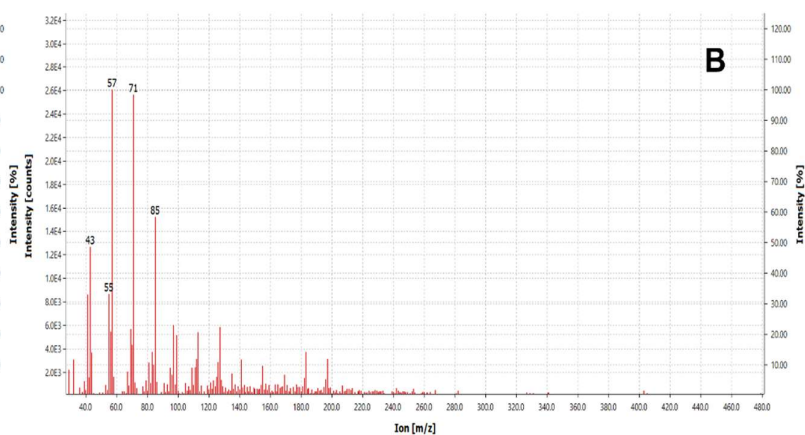
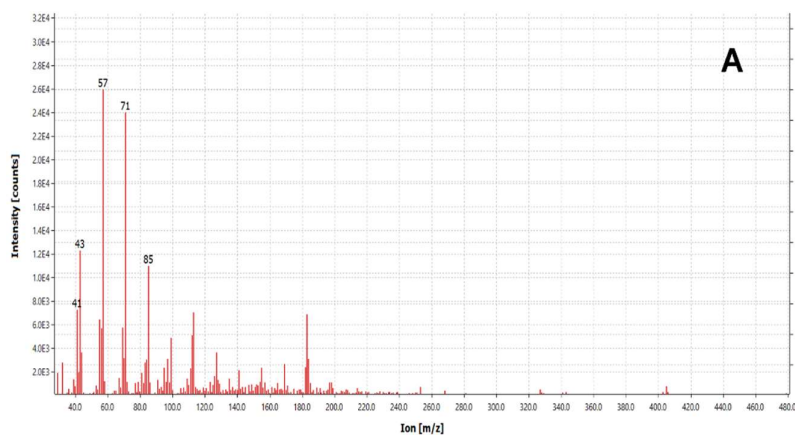
Anexo 1. Espectros de masas de la muestra A1P2.

(A) Espectro de masas de pristano por extracción en micro-Soxhlet; (B) Espectro de masas de fitano por extracción en micro-Soxhlet; (C) Espectro de masas de pristano por extracción en ultrasonido; (D) Espectro de masas de fitano por extracción en ultrasonido.



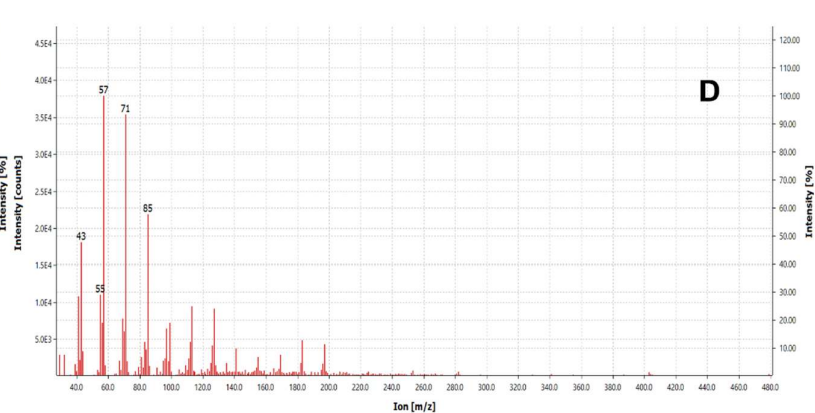
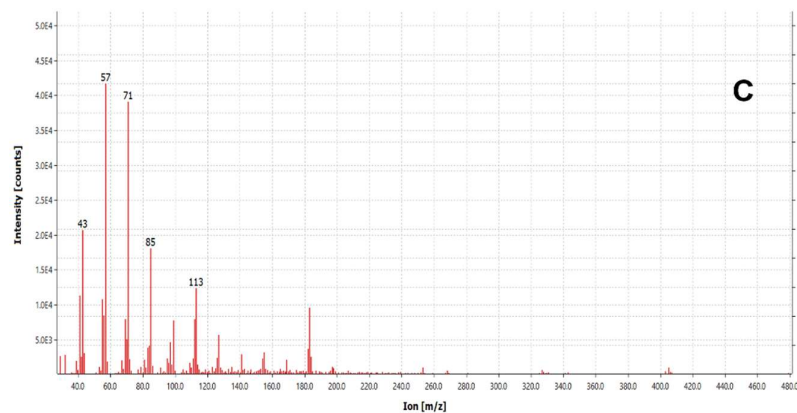
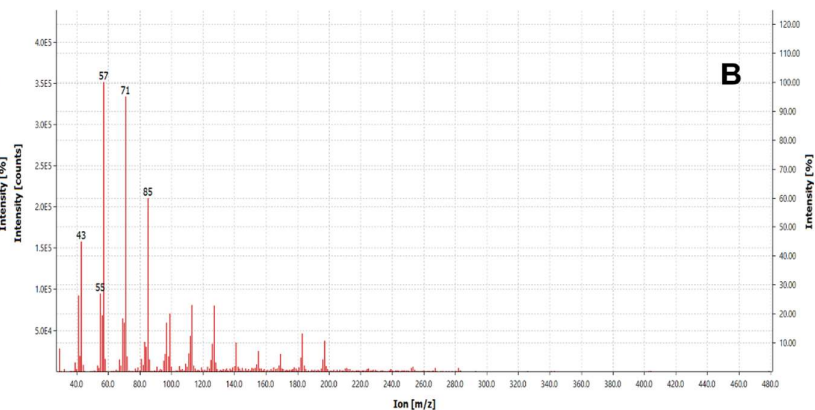
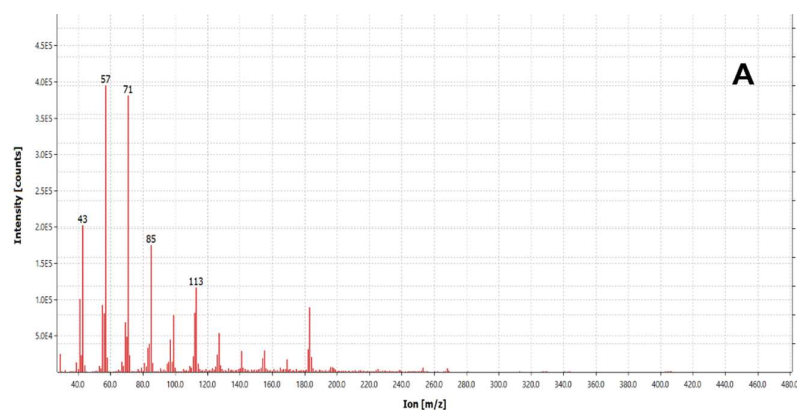
Anexo 2. Espectros de masas de la muestra A1R2.

(A) Espectro de masas de pristano por extracción en micro-Soxhlet; (B) Espectro de masas de fitano por extracción en micro-Soxhlet; (C) Espectro de masas de pristano por extracción en ultrasonido; (D) Espectro de masas de fitano por extracción en ultrasonido.



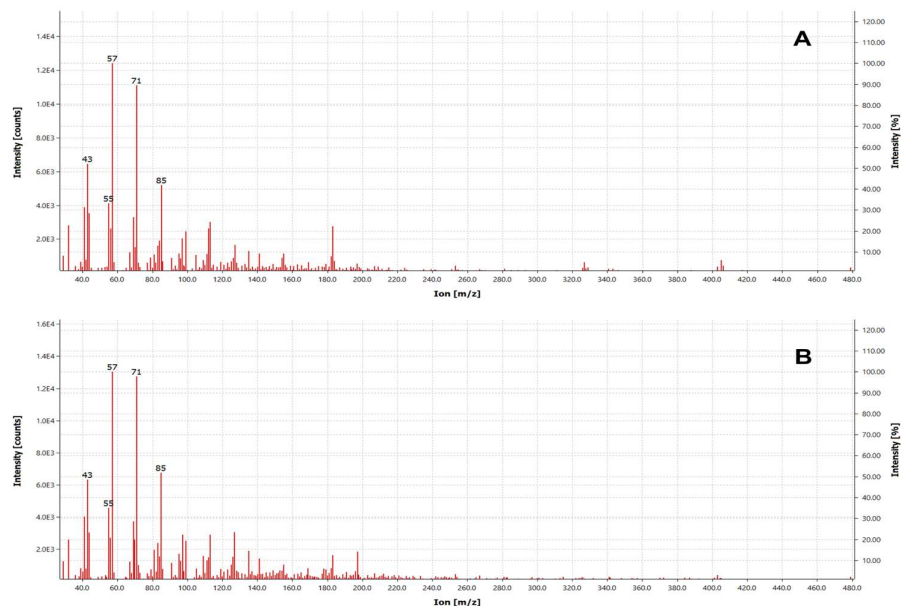
Anexo 3. Espectros de masas de la muestra C1P2.

(A) Espectro de masas de pristano por extracción en micro-Soxhlet; (B) Espectro de masas de fitano por extracción en micro-Soxhlet; (C) Espectro de masas de pristano por extracción en ultrasonido; (D) Espectro de masas de fitano por extracción en ultrasonido.



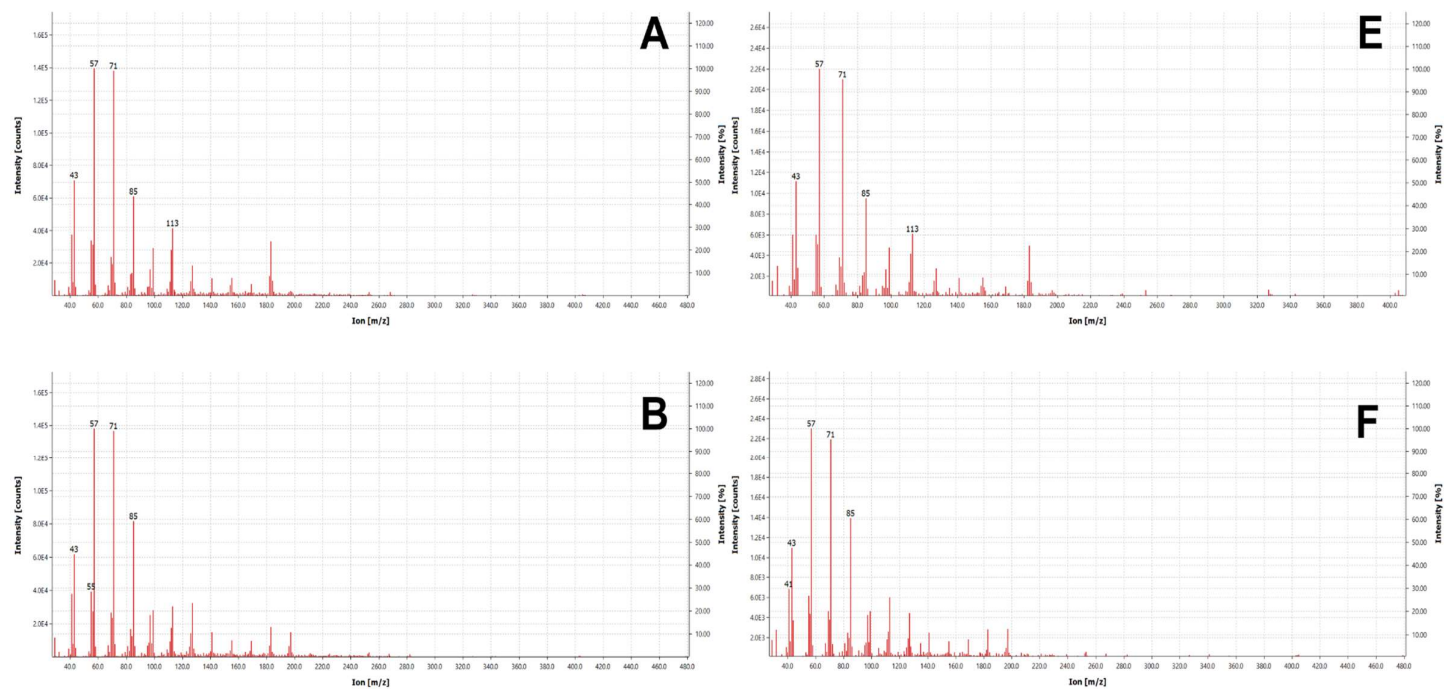
Anexo 4. Espectros de masas de la muestra C1R1.

(A) Espectro de masas de pristano por extracción en micro-Soxhlet; (B) Espectro de masas de fitano por extracción en micro-Soxhlet.

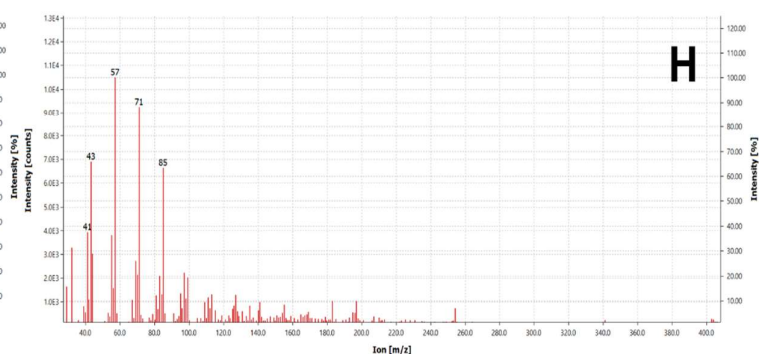
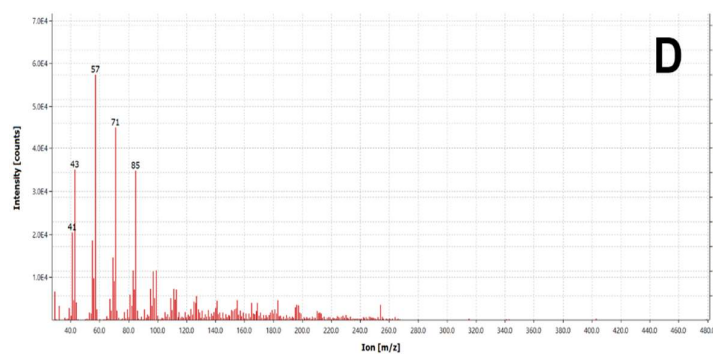
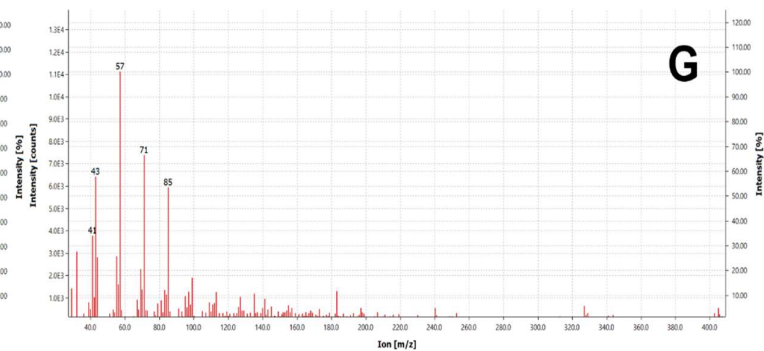
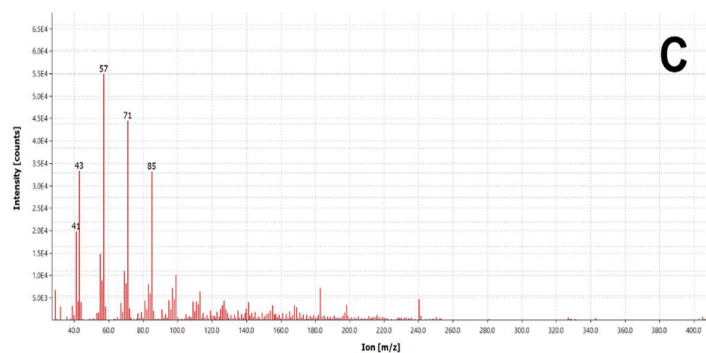


Anexo 5. Espectros de masas de la muestra E1P1.

(A) Espectro de masas de pristano por extracción en micro-Soxhlet; (B) Espectro de masas de fitano por extracción en micro-Soxhlet; (E) Espectro de masas de pristano por extracción en ultrasonido; (F) Espectro de masas de fitano por extracción en ultrasonido. Sigue en la siguiente página.



Anexo 5 (cont.). (C) Espectro de masas de C₁₇ por extracción en micro-S Soxhlet; (D) Espectro de masas de C₁₈ por extracción en micro-S Soxhlet; (G) Espectro de masas de C₁₇ por extracción en ultrasonido; (H) Espectro de masas de C₁₈ por extracción en ultrasonido.



Anexo 6. Parámetros cromatográficos (Tiempo de retención -TR y área) de los picos de C17, C18, pristano y fitano en todas las muestras analizadas.

	C ₁₇		C ₁₈		Pristano		Fitano	
	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área
A1P1S	ND	ND	ND	ND	10,393	17140780	11,434	16934595
A1P2S	ND	ND	ND	ND	10,393	8857563	11,434	8680528
A1P1U	ND	ND	ND	ND	10,393	573880	11,434	844243
A1P2U	ND	ND	ND	ND	10,393	2563775	11,434	2886439
A1R1S	ND	ND	ND	ND	10,393	8637501	11,428	9033411
A1R2S	ND	ND	ND	ND	10,393	2544418	11,434	3073853
A1R1U	ND	ND	ND	ND	10,387	121427	11,428	161042
A1R2U	ND	ND	ND	ND	10,393	1450803	11,434	1618730
C1P1S	ND	ND	ND	ND	10,399		11,44	
C1P2S	ND	ND	ND	ND	10,399	43565816	11,44	45316278
C1P1U	ND	ND	ND	ND	10,399	3310345	11,439	3222766
C1P2U	ND	ND	ND	ND	10,393	4522787	11,434	4301034
C1R1S	ND	ND	ND	ND	10,399	1334714	11,44	1298046
C1R2S	ND	ND	ND	ND	10,399	1498272	11,44	1804265
C1R1U	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C1R2U	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E1P1S	10,334	4736919	11,339	5048611	10,399	14883660	11,44	18513414
E1P2S	10,34	5127678	11,339	5209232	10,399	13203455	11,44	17007764
E1P1U	10,334	612925	11,338	881121	10,399	2329897	11,44	2714473
E1P2U	10,334	1149536	11,339	1387439	10,399	3273442	11,44	4196841
E1R1S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E1R2S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E1R1U	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E1R2U	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
X1S	10,328	171024	11,327	207808	10,393	926691	11,434	966773
X2S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
X1U	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
X2U	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B1S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B2S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B1U	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B2U	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

En los códigos de muestras: S-micro soxhlet, U-ultrasonido, 1 y 2 denotan las réplicas