UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
VICERRECTORADO ACADÉMICO
DIRECCIÓN GENERAL DE LOS ESTUDIOS DE POSTGRADO
ÁREA DE INGENIERIA
POSTGRADO EN INGENIERIA AMBIENTAL

LAS RELACIONES ISOTÓPICAS DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS DE HIDROCARBUROS (CSIA) APLICADA EN LAS CIENCIAS FORENSES AMBIENTALES ASOCIADAS A LOS DERRAMES PETROLEROS MARINOS

Trabajo Especial de Maestría, presentado para optar al grado de Magister en Ingeniería Ambiental

Autor: Lic. Yohana de las Mercedes Agüero Manzano
Asesor: MSc. Antonieta Melone

Caracas, Febrero de 2019

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
VICERRECTORADO ACADÉMICO
DIRECCIÓN GENERAL DE LOS ESTUDIOS DE POSTGRADO
ÁREA DE INGENIERIA
POSTGRADO EN INGENIERIA AMBIENTAL

LAS RELACIONES ISOTÓPICAS DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS DE HIDROCARBUROS (CSIA) APLICADA EN LAS CIENCIAS FORENSES AMBIENTALES ASOCIADAS A LOS DERRAMES PETROLEROS MARINOS

Trabajo Especial de Maestría, presentado para optar al grado de Magister en Ingeniería Ambiental

Autor: Lic. Yohana de las Mercedes Agüero Manzano
Asesor: MSc. Antonieta Melone

Caracas, Febrero de 2019

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
Urb. Montalbán - La Vega - Apartado 20332
Telf.: (0212) 407-44-44 Fax: 407-43-49
Estudios de Postgrado
Rif. J-00012255-5

ACTA DE EVALUACIÓN DE PRESENTACIÓN Y DEFENSA DE TRABAJO DE GRADO DE MAESTRÍA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

Nosotros, Profesores ANTONIETTA MELONE MAZZARELLA (tutor), RAFAEL MUÑIZ ÁLVAREZ y NICOLA CECI, designados por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ingeniería a los dieciseis días del mes de enero del año dos mil diecinueve, para conocer y evaluar en nuestra condición de jurado del Trabajo de Grado de Maestría " LAS RELACIONES ISOTOPICAS DE COMPUESTOS ESPECIFICOS DE HIDROCARBUROS (CSIA) APLICADAS EN LAS CIENCIAS FORENSES AMBIENTALES ASOCIADAS A LOS DERRAMES PETROLEROS MARINOS ", presentado por la ciudadana Aguero Manzano, Yohana de las Mercedes, C.I. N°. 14746082, para optar al grado de Magister en Ingeniería Ambiental.

Declaramos que:

Después de haber estudiado dicho trabajo, presenciamos la exposición del mismo, a los quince días del mes de febrero del año dos mil diecinueve, en la sede de los Estudios de Postgrado de la Universidad Católica Andrés Bello.

Hechas por nuestra parte, las preguntas y aclaratorias correspondientes y, una vez terminada la exposición y el ciclo de preguntas, hemos considerado formalizar el siguiente veredicto:

APROBADO

Hemos acordado calificar la presentación y defensa del Trabajo de Grado de Maestría con Veinte (20) puntos.

(Observaciones o declaratoria de recomendación)

En fe de lo cual, nosotros los miembros del jurado designado, firmamos la presente acta en Caracas, a los quince días del mes de febrero del año dos mil diecinueve.

Nombre y firmas del jurado evaluador:

Antonietta Melone Mazzarella	**Rafael Muñiz Álvarez**	**Nicola Ceci**
C.I.: 1014741	**C.I.:** 4270076	**C.I.:** 10.484.535

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA
MONTALBAN

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO

VICERRECTORADO ACADÉMICO

DIRECCIÓN GENERAL DE LOS ESTUDIOS DE POSTGRADO

ÁREA DE INGENIERIA

POSTGRADO EN INGENIERIA AMBIENTAL

APROBACION DEL TUTOR

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado, presentado por la ciudadana Licenciada Yohana de las Mercedes Agüero Manzano, portador de la Cédula de Identidad v-14.746.082 para optar al Título de Magíster en Ingeniería Ambiental, cuyo título es: Las relaciones isotópicas de compuestos específicos de hidrocarburos (CSIA) aplicada en las ciencias forenses ambientales asociadas a los derrames petroleros marinos; considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En la Ciudad de Caracas, a los 15 días del mes de Febrero de 2019.

_____

MSc. Antonieta Melone

CI. E-1.014.741

DEDICATORIA

Durante el andar de este trabajo, se presentaron momentos en los que muchas veces la única solución que parecía ser la más sencilla era abandonar, se presentaron momentos de suma dificultad, donde la cotidianidad se llenó de tribulaciones.

Pero, en esos mismos momentos, tuve la dicha de poder disfrutar y contar con el apoyo de mi madre, apoyo que más que de carácter moral, representaron la motivación y planteamiento de metas necesarias para poder proseguir a la gran meta, culminar mi trabajo. Gracias a mi madre por creer y confiar en mí, gracias a Dios por la vida de mi madre, y gracias a la vida por permitirme verla y disfrutar cada día a su lado.

Madre, quiero agradecerte primero por darme la vida, por darme una infancia llena de felicidad, por la formación y educación que con mucho esfuerzo e ímpetu lograste enseñarme, por darme una hermana maravillosa y por darme la lección más grande de vida que es la vida misma.

Gracias a mi madre que siempre ha estado para extenderme sus brazos, por convertir los malos pasos en momentos de reflexión, por escucharme y siempre tener algo que decirme para continuar mi camino, por prestarme su hombro para desahogarme, por ser mi cómplice en tantas travesuras, por prepararme mis platos favoritos, y por consentirme hasta hoy como si aún fuera su pequeña.

Tu vida, tu legado, tu esfuerzo son impresionantes y tu amor es para mí invaluable. Gracias Madre, por tu gran amor y devoción, apoyo incondicional, esa fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos. Me has educado y proporcionado todo lo que he necesitado para vivir la vida como me gusta con: amor, comprensión, lealtad, respeto, empatía, camaradería y justicia; tus enseñanzas las aplico cada día.

Por todo,

Gracias infinitas, Corito

AGRADECIMIENTOS

Al Creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando he estado a punto de caer; por ello con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

A mis padres. Quiero agradecer a mi madre, por su amor, apoyo, ejemplo de constancia e integridad. Mi gran amiga, eres mi mundo Corito. A mi padre, que aunque te perdí a muy temprana edad, tengo la certeza que siempre estas cuidándome y guiándome desde el otro plano. Quiero agradecer a mi ángel guardián, mi protectora incondicional, que toda su vida me apoyó y me dio amor y cariño. Abuelita te agradezco con todo mi corazón.

A mi niña de oro, por su amor y su amistad verdadera e inocencia. Mi sobrina ahijada, Valeria Sofía, es maravilloso acompañarte y estar en tantos momentos. Eres sencillamente maravillosa.

A mi hermana, que siempre ha estado junto a mí brindándome su apoyo, entusiasmo y tu amor incondicional.

A mi tío Williams, el gran Pajarito. Tu entusiasmo, tu alegría y el amor por la vida, siempre marcan cada paso que doy en la vida.

A Rafael, amigo incondicional, gracias por tu amistad, conversaciones enriquecedoras y tu compañía permanente.

A Manchita, mi amiga de 4 patas, en cada palabra plasmada en este documento está su calor peludo y compañía permanente al lado de mi silla.

A toda mi familia, por sus palabras de aliento y sus buenos deseos.

A mi tutor académico, la profesora Antonieta Melone, por su apoyo permanente y consejos pertinentes para la elaboración de este trabajo. A Delfín Rivas, mi tutor industrial, por su incondicional apoyo, integridad y aplomo, ejemplo de profesionalismo y vocación a la investigación. Mi respeto y admiración.

A la Universidad Católica Andrés Bello, que me permitió formarme en el área; a mis profesores que compartieron conmigo sus conocimientos a lo largo de mi formación.

A PDVSA Intevep por permitirme realizar este trabajo, proporcionándome no solo tiempo y recursos financieros, sino todas las capacidades técnicas y científicas que posee.

A mis amigos que en la distancia están presente: Wadih, María, Mónica y Dorfe. Ustedes son parte de este viaje que llamamos vida. A mis amigos que están presentes y en el ahora, Alejandro Enrique (primo bello), Exarella (prima/comadre), Olga y Miriam, su amistad, su compañía y sus palabras de ánimo. Gracias a todos.

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
VICERRECTORADO ACADÉMICO
DIRECCIÓN GENERAL DE LOS ESTUDIOS DE POSTGRADO
ÁREA DE INGENIERIA
POSTGRADO EN INGENIERIA AMBIENTAL

LAS RELACIONES ISOTÓPICAS DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS DE HIDROCARBUROS (CSIA) EN LAS CIENCIAS FORENSES AMBIENTALES ASOCIADAS A LOS DERRAMES PETROLEROS MARINOS

Autor: Lic. Yohana de las Mercedes Agüero Manzano
Asesor: MSc. Antonieta Melone
Fecha: Febrero 2019

RESUMEN

La dependencia de la acción humana en el petróleo, demanda la producción de grandes cantidades de crudo y su subsecuente transporte a lo largo del planeta. El transporte es la principal fuente de contaminación por hidrocarburos ya que 60% de la producción mundial se transporta por vía marítima y se calcula que el 0,1% de éste se derrama al mar (2,2 millones de toneladas al año). La determinación de la fuente, el impacto y la estimación del tiempo del daño, son estudiadas a través de la ciencia forense ambiental, que evalúa las propiedades químicas y físicas del contaminante. La degradación microbiana sobre el crudo derramado, causa cambios en su composición química, de manera que, su caracterización y correlación con las potenciales fuentes, se deben evaluar con técnicas analíticas, que aportan confiabilidad y precisión en los datos analíticos, que en conjunción a la comprensión de la historia del evento, permite establecer con éxito el origen de la contaminación.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo establecer el análisis isotópico de los compuestos específicos de hidrocarburos (CSIA), como una herramienta analítica confiable en el campo de la ciencia forense ambiental aplicada a las operaciones petroleras.

Los resultados obtenidos permitieron apreciar que a través de las técnicas analíticas convencionales, durante la degradación bacteriana, se producen cambios en la composición molecular del crudo (por ejemplo: agotamiento de las cadenas de bajo peso molecular en la fracción saturada). Sin embargo, con la medición de la relación isotópica (propiedad refractaria), se observa que sus valores no sufren variaciones significativas, específicamente los CSIA en la fracción saturada son inalterables durante el proceso de biodegradación, estableciéndola como una herramienta forense útil para la correlación entre la fuente de la contaminación y el crudo derramado en medio marino.

Palabras clave: relaciones isotópicas, CSIA n-alcanos, ciencia forense ambiental, derrames petroleros marinos, huellas características.

INDICE DE CONTENIDO

	Pagina
RESUMEN	i
INDICE DE CONTENIDO	ii
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	x
INTRODUCCION	1
CAPITULO 1. EL PROBLEMA	4
1.1. Planteamiento del Problema	4
1.2. Objetivos de la Investigación	7
1.2.1. Objetivo general	7
1.2.2. Objetivos específicos	7
1.3. Justificación e Importancia	8
1.4. Alcance	9
1.5. Consideraciones Éticas y Legales	9
CAPITULO 2. MARCO TEORICO	12
2.1. Antecedentes de la investigación	12
2.2. Fundamentos Teóricos	17
2.2.1. Ciencia Forense Ambiental	17
2.2.1.1. Definición	17
2.2.1.2. Accidentes o derrames petroleros	20
2.2.1.3. Fuentes de contaminación por hidrocarburos en el mar	20
2.2.1.4. Procesos de alteración en hidrocarburos en el medio marino	22
2.2.1.5. Rutas marítimas internacionales de transporte de hidrocarburos	35

2.2.1.6. Métodos de análisis convencionales empleados en derrames petroleros 37

2.2.2. Geoquímica Orgánica del Petróleo 45

2.2.2.1. Crudo Definición 46

2.2.2.2. Procesos de alteración del crudo 49

2.2.2.3. Caracterización del crudo a través de la Geoquímica Orgánica 50

2.2.3. Isótopos 55

2.2.3.1. Definición 55

2.2.3.2. Notación de abundancia isotópica 55

2.2.3.3. Tipos de isótopos 56

2.2.3.4. Relaciones isotópicas en compuestos específicos de hidrocarburos (CSIA) 57

2.2.3.5. Factores que afectan las relaciones isotópicas durante la generación del crudo (biodegradación, madurez y origen de la roca fuente) 59

2.2.3.6. Aplicaciones de los compuestos específicos en los n-alcanos (CSIA n-alcanos) en el área de exploración: Correlación entre crudo–crudo y crudo–roca fuente 67

2.3. Fundamentos Legales 70

CAPITULO 3. MARCO METODOLOGICO 74

3.1. Tipo, nivel y diseño de investigación 74

3.2. Sistema de Variables 75

3.2.1. Definición conceptual 75

3.2.2. Definición operacional 77

3.3 . Población y Muestra 77

3.4. Técnicas e Instrumentos de Recolección de datos 81

3.4.1. Instrumental analítico empleado 84

3.4.1.1. Análisis de hidrocarburos saturados (C_{15}^{+}) 84

3.4.1.2. Análisis de Biomarcadores saturados y marcadores aromáticos 84

3.4.1.3. Análisis de las relaciones isotópicas de los compuestos individuales de carbono en la fracción saturada (CSIA) 85

3.4.2. Procedimiento Experimental 86

3.4.2.1. Diseño de experimentos de las simulaciones controladas a escala de laboratorio de biodegradación 86

3.4.2.2. Simulaciones controladas a escala de laboratorio para evaluar las condiciones óptimas de biodegradación en un derrame de crudo 88

3.4.2.3. Cuantificación bacteriológica 92

3.4.2.4. Deshidratación de crudo 96

3.4.2.5. Análisis SARA 96

3.4.2.6. Análisis de hidrocarburos saturados C_{15}^{+} 98

3.4.2.7. Análisis de Biomarcadores saturados y marcadores aromáticos 99

3.4.2.8. Análisis de las relaciones isotópicas de los compuestos individuales de carbono en la fracción saturada (CSIA) 99

3.5. Factibilidad de la investigación 102

3.5.1. Recursos Humanos 102

3.5.2. Recursos Materiales 102

3.5.3. Recursos Financieros 102

CAPITULO 4. ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS 103

CAPITULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 135

5. CONCLUSIONES 135

6. RECOMENDACIONES 136

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 137

INDICE DE TABLAS

		Pagina
Tabla 1.	*Comportamiento característico de los derrames en suelo y agua*	18
Tabla 2.	*Clasificación de las fuentes de hidrocarburos al medio marino*	21
Tabla 3.	*Clasificación de la contaminación por hidrocarburos*	22
Tabla 4.	Composición del crudo en fracciones	47
Tabla 5.	Clasificaciones más usadas de los crudos	48
Tabla 6.	Procesos de alteración del crudo	49
Tabla 7.	Abundancia de los isótopos naturales más comunes en la naturaleza	56
Tabla 8.	Composición química y datos de madurez molecular de las muestras analizadas	63
Tabla 9.	Legislación ambiental aplicable a la investigación	71
Tabla 10.	Identificación y conceptualización de las variables	76
Tabla 11.	Operacionalización de las Variables	77
Tabla 12.	Características del crudo CX, empleado en las simulaciones experimentales	79
Tabla 13.	Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua de mar recolectadas	80
Tabla 14.	Variables del proyecto con sus respectivos instrumentos de medición	82
Tabla 15.	Criterios numéricos para la recolección de datos en instrumentales analíticos	83
Tabla 16.	Instrumentación utilizada para el análisis de hidrocarburos saturados C_{15}^{+}	84
Tabla 17.	Instrumentación utilizada para el análisis de biomarcadores saturados y aromáticos	85
Tabla 18.	Instrumentación utilizada para el análisis de los CSIA	85
Tabla 19.	Matriz de diseño factorial de las simulaciones	88
Tabla 20.	Condiciones experimentales en la simulación del proceso de biodegradación a escala de laboratorio en derrames marinos	90

Tabla 21. Condiciones experimentales óptimas para el desarrollo del proceso de biodegradación en la simulación a escala de laboratorio de derrames de crudo en medio marino 91

Tabla 22. Promedios de los parámetros fisicoquímicos del agua de mar de Carenero previo a las simulaciones 104

Tabla 23. Porcentajes relativos de las fracciones del crudo derramado (CX) 112

Tabla 24. Variabilidad de parámetros geoquímicos de los crudos recolectados en las simulaciones 120

Tabla 25. Valores isotópicos de los CSIA de carbono en la fracción saturada del crudo CX y en diferenciales de capacidad de tanqueros, con sus respectivos números promedios y desviaciones estándar 128

Tabla 26. Valores isotópicos de los CSIA de carbono para Venezuela, China, Australia y Colombia 131

INDICE DE FIGURAS

		Pagina
Figura 1.	Diagrama que representa los tres (3) factores relevantes que afectan las huellas químicas del crudo en una investigación forense	23
Figura 2	Principales procesos de envejecimiento de los hidrocarburos y sus escalas temporales	25
Figura 3	Cromatogramas GC-FID, donde se aprecia la pérdida progresiva de compuestos en un crudo de 34°API derramado durante el huracán Katrina en Estados Unidos. En el (A) está el crudo levemente evaporado, (B) moderadamente evaporado y (C) severamente evaporado	28
Figura 4	Cromatogramas GC-FID muestran los efectos de la precipitación de ceras en las huellas químicas de un crudo parafínico. (A) crudo iniciando precipitación. (B) fracción de cera empobrecida dentro del crudo derramado, 71 horas después del derrame. (C) Fracción de cera enriquecida dentro del crudo derramado, 72 horas después del derrame	35
Figura 5	Rutas marítimas internacionales para el transporte de combustibles fósiles	36
Figura 6	Cromatogramas GC-FID y GC-MS (m/z=191) para un crudo derramado y dos crudos provenientes de dos plataformas cercanas al derrame	39
Figura 7	GC-FID de un crudo derramado que ha sufrido meteorización.	40
Figura 8.	Gráfica de la relación C_2/C_3 dibenzotiofenos con respecto a C_2/C_3 fenantrenos de residuos de crudos desde la zona de *Prince Williams Sound*, Alaska, luego de 8 años al derrame de la *Exxon Valdez*. La muestra identificada con NSC es el crudo original	41
Figura 9.	Porción del cromatograma de volatilidad por polaridad de las 3 muestras analizadas por GC x GC. La muestra del derrame se muestra en el panel A, la Fuente 1, en el panel B y la Fuente 2 en el panel C. Las cajas contienen familias de compuestos y compuestos individuales	44
Figura 10.	Distribución de n-alcanos e isoprenoides (pristano Pr y fitano Ph), obtenida por cromatografía de gases para la fracción de hidrocarburos saturados de un crudo de los llanos colombianos	52

Figura 11.	Diagrama del GC-IRMS y sus principales componentes	59
Figura 12	Comparación de las relaciones isotópicas de los n-alcanos (símbolos cerrados: n-alcanos y símbolos abiertos: isoprenoides	61
Figura 13.	Relación isotópica de n-alcanos medidos en crudos totales	64
Figura 14.	Cromatogramas representativos de los hidrocarburos saturados en función de la biodegradación	65
Figura 15.	Perfiles isotópicos de carbono de una secuencia natural con progresiva biodegradación	66
Figura 16	Perfiles isotópicas de n-alcanos de muestras seleccionadas de los Llanos colombianos	68
Figura 17.	Ubicación geográfica de los puntos de muestreo en planta de distribución Carenero (Higuerote, estado Bolivariano de Miranda)	80
Figura 18.	Conceptualización de los diferentes procesos de alteración a los que son sometidos el crudo derramado en mar	87
Figura 19.	Montaje de las simulaciones controladas en el laboratorio, por semana. En la parte derecha, se observan las muestras control (agua destilada y crudo) para cada diferencial de tiempo	92
Figura 20	Esquema general para el recuento bacteriológico (método *Spread*) de acuerdo a las normas ISO 6222 e ISO 8199	93
Figura 21.	Sistema de diluciones para la cuantificación bacteriológica	94
Figura 22.	Cuantificación bacteriológica. En las capsulas de *Petri*, se observa el crecimiento bacteriológico evidente	95
Figura 23.	Montaje de la cromatografía de absorción en columna para la separación de las fracciones del crudo	97
Figura 24.	Esquema general detallado para las simulaciones controladas en el laboratorio del proceso de biodegradación marina	101
Figura 25.	Cuantificación bacteriológica inicial. En las capsulas de *Petri*, se observa el crecimiento bacteriológico	105
Figura 26.	Concentración de bacterias después del derrame con el crudo durante 14 días. La línea con asterisco cercana al eje de las coordenadas X, representa los controles con agua destilada con crudo	106

Figura 27. Concentración de bacterias del derrame de crudo durante 14 días. La línea con asterisco sobre el eje de las coordenadas X, representa los controles con agua destilada y crudo 107

Figura 28. Concentración de bacterias después del derrame simulado durante 14 días. La línea con rombos sobre el eje de las coordenadas X, representa los controles con agua destilada y crudo 108

Figura 29. Concentración de bacterias después de interaccionar con el crudo a diferentes tiempos. La línea con rombos sobre el eje de las coordenadas X, representa los controles con agua destilada y crudo 110

Figura 30. Variaciones en los porcentajes relativos de las fracciones del crudo con respecto a los cambios en la concentración microbiana en función del tiempo (año 2017) 113

Figura 31. Clasificación de las muestras de crudo recolectadas durante las simulaciones (años 2017 y 2018) 115

Figura 32. Superposición de los cromatogramas para las muestras de crudo semana 0 (crudo original CX) y la semana 15 de exposición a la biodegradación 117

Figura 33. Valores relativos (%) de los n-alcanos individuales de los crudos recolectados durante las simulaciones 118

Figura 34. Distribución de n-alcanos y de los isoprenoides (Pr y F) en el crudo CX para la semana 0 de exposición bacteriana 119

Figura 35. Fragmentograma m/z 253 para las muestras CX original y en la semana 15, donde se observan los esteranos monoaromáticos 122

Figura 36. Fragmentograma m/z 231 para las muestras CX original y en la semana 15, donde se observan los esteranos triaromáticos 123

Figura 37. Aumento relativo de las cadenas C_{26}, C_{27} y C_{28}, asociado al consumo del consorcio bacteriano de los esteranos de 20 y 21 124

Figura 38. Cromatogramas para el crudo CX y a los diferenciales de tiempo de exposición a la actividad bacteriana, a través de la técnica GC-IRMS 126

Figura 39. Tendencias isotópicas obtenidas durante los diferenciales de tiempo de exposición de actividad bacteriana 129

Figura 40. Perfiles isotópicos de los CSIA de la fracción saturada para Venezuela, China, Australia y Colombia 132

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

CSIA	Análisis isotópico de compuestos específicos de hidrocarburos
C, H, Cl	Carbono, hidrogeno y cloro
CPI	Índice preferencial de carbono, que en ingles significa *Carbon Preference Index*
EEUU	Estados Unidos de América
EIA	Oficina de Administración de Información Energética de los Estados Unidos
$ESBTU_{FCV, 43}$	Unidad de toxicidad de Benchmark
FID	detector de ionización de llama (*Flame Ionization Detector* por sus siglas en inglés)
GC	Cromatografía de gases
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
GC X GC	Cromatografía de gases en dos dimensiones
GC-IRMS	*Gas chromatography- Isotope ratio mass spectrometry* por sus siglas en inglés, en español significa Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas de relaciones isotópicas
GC-MS	*Gas chromatography coupled mass spectrometry* por sus siglas en ingles que en español significa cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas
Gravedad API	Parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo
IRMS	Isotope ratio mass spectrometry por sus siglas en inglés, en español significa Espectrometría de masas de relaciones isotópicas
ITOF	*International Tankers Oil Pollution Fund* por sus siglas en ingles que en español significa Internacional de derrames petroleros
Notación δ	Expresión convencional de abundancias isotópicas
N, S, O	Nitrógeno, azufre, oxigeno
OPEP	Organización de Países Exportadores de Petróleo
PAC	Compuestos poliaromáticos
PAH	Hidrocarburos Poliaromáticos

PASH	Compuestos poliaromáticos de azufre
PDVSA	Petróleos de Venezuela, S. A.
PDVSA-INTEVEP	Petróleos de Venezuela, S. A.-Instituto Tecnológico Venezolano de Petróleo
P/F	Relación Pristano/Fitano
PTE	Planta de tratamiento de efluentes
Relación m/z	Esta expresión, abreviada m/z, es la relación del número de masa (m) de una partícula dada entre el número (z) de unidades cargadas electrostáticamente € que posee la partícula
RSD	*Relative standard deviation* por sus siglas en ingles que en español significa desviación estándar relativa
SARA	*Saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos*
UCM	Material carbonoso irresoluble
V y Ni	Vanadio y níquel
V_{PDB}	Estándar empleado en isotopos de oxígeno y carbono, que se significa *PeeDee Belemnite* por sus siglas en ingles
% SARA	Porcentaje del contenido saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos en crudos
% S	Porcentaje del contenido de azufre en crudos

INTRODUCCION

La dependencia de la actividad humana en el petróleo, demanda una producción de grandes cantidades de éste para satisfacer el mercado mundial, produciendo afectación sobre los ecosistemas. Entre los más graves desastres que atentan contra la biodiversidad, se encuentran los derrames de petróleo en los mares y océanos. El petróleo y sus productos refinados, son mezclas de varios hidrocarburos y otros compuestos cuyas propiedades físicas y químicas son muy variadas. Este hecho determina su comportamiento e impacto en los elementos ambientales (recursos físicos, recursos biológicos y actividades socioeconómicas) cuando ocurre un derrame.

La producción y el transporte de petróleo por vía marítima, son las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos (ITOF, 2017). Wang, Wang y He (2015), son precisos a describir que los derrames petroleros pueden ocurrir durante los procesos de explotación, almacenamiento, transporte, producción o el mismo consumo; causando graves daños al ambiente, a la salud y a los recursos naturales. Sin embargo, resaltan que el 60% de la producción mundial de petróleo es transportada por medios marinos y se calcula que el 0,1% de éste es derramado en el mar (2,2 millones de toneladas al año).

Desde el comienzo del siglo XXI, se ha estado desarrollando dentro del ámbito científico una disciplina conocida como ciencia forense ambiental, que incluye la evaluación de la contaminación del sitio afectado, recomendaciones de remediación o restauración, y una determinación probable de costos entre las partes responsables de la limpieza y restauración del sitio (Raia, Blakley y Fuex, 2008). Esta área del conocimiento está basada en métodos analíticos, estudios ambientales, normas o leyes ambientales, entre otros aspectos, que le permite realizar un estudio sistemático de la información de fuentes específicas de contaminación química, tiempos de liberación al ambiente y distribución espacial de la contaminación (Haddad, 2010).

Posterior a un derrame marino de hidrocarburos, el crudo es sometido a una variedad de procesos de meteorización, que modifican la composición molecular de éste y los parámetros utilizados para correlacionarlo con su potencial fuente. Lo que hace necesario, emplear herramientas analíticas confiables dentro de la ciencia forense ambiental. Dichas técnicas analíticas deben poseer una mejor resolución (propiedades refractarias) que permitan propiedades características del crudo y sus fracciones.

La GC-IRMS (por sus siglas en ingles), es una técnica analítica usada ampliamente en la Geoquímica Orgánica del Petróleo, para la caracterización de crudos y la correlación con su posible roca fuente. Lo que hace robusta este instrumental, es la propiedad específica que mide, ya que, es a nivel del núcleo del átomo, en sus relaciones nucleares entre el más abundante y el menos, capaz de mantenerse estable por un tiempo prolongado bajo cualquier proceso de alteración (por ejemplo: biodegradación, enriquecimiento de ceras, alteración térmica, desafaltación, entre otros).

La industria petrolera ha experimentado a través del tiempo, retos en la caracterización de los yacimientos por su complejidad, obligando a buscar herramientas de análisis con mayor poder de resolución, en función de las relaciones isotópicas del crudo, como el análisis isotópico de compuestos específicos (CSIA), que permiten construir con mayor precisión la historia del yacimiento. Noruega, Estados Unidos, Holanda, Alemania y Venezuela, han evaluado la tendencia de las relaciones isotópicas en crudos y su correlación con las posibles rocas fuente, obteniéndose resultados exitosos en el área de exploración y caracterización de yacimientos.

El trabajo de investigación realizado tiene como objetivo establecer el análisis isotópico de los compuestos específicos individuales de carbono (CSIA) en crudos venezolanos, como una herramienta confiable para la correlación del origen de contaminación y crudos derramados, ofreciendo una solución técnica y práctica, para establecer huellas ambientales con mayor nivel de resolución molecular, y así disminuir los costos asociados a la adquisición de tecnología foránea, planteando soluciones nacionales en el campo de la ciencia forense ambiental aplicada a las operaciones petroleras.

El cuerpo del documento se estructuró de la siguiente manera: en el Capítulo 1, se presenta El Problema, los objetivos que enmarcan el estudio, tanto el general como los específicos y la justificación e importancia de la investigación.

El Capítulo 2, contiene el Marco Teórico, en él se detallan los antecedentes que sirvieron de soporte a la investigación, así mismo se desarrollan las Teorías de Entradas o Bases Teóricas con los diferentes enfoques teóricos que sostienen a este estudio, los fundamentos legales que se relacionan con el tema y la definición de los términos básicos que se emplean en la investigación.

En el Capítulo 3, se puntualizó el Marco Metodológico que explica el tipo de investigación dentro del cual se enmarcó el trabajo. Continuando, con la población y la muestra así como las técnicas e instrumentos de recolección de datos empleados.

Posteriormente en el Capítulo 4, se presentan el Análisis e Interpretación de los resultados.

Finalmente, el Capítulo 5, contentivo de las Conclusiones y Recomendaciones producto del estudio realizado. Asimismo, se incluyen las referencias bibliográficas utilizadas en la investigación.

CAPITULO 1

EL PROBLEMA

En este primer capítulo se describe la investigación, a través del planteamiento del problema, concerniente a las implicaciones legales, políticas, ambientales y económicas de los derrames petroleros, además de la ausencia de tecnología y falta de aplicaciones técnicas modernas que permitan resolver posibles arbitrajes en esta materia. Posteriormente, las preguntas asociadas a la investigación, los objetivos general y específicos, la importancia y justificación, así como el alcance de este trabajo de investigación.

1.1. Planteamiento del Problema

Los hidrocarburos son la fuente principal de energía para muchas actividades humanas de la sociedad actual. El crudo y sus productos refinados son el resultado de una mezcla de varios hidrocarburos y otros compuestos, cuyas propiedades físicas y químicas son muy variadas, lo que determina su comportamiento e impacto en los elementos ambientales (recursos físicos, recursos biológicos y actividades socioeconómicas) cuando ocurre un derrame.

Los efectos contaminantes del petróleo han generado inmensa preocupación por su gran impacto negativo al ambiente. Los derrames son una de las afectaciones que ocurren con mayor frecuente, debido a accidentes o prácticas inadecuadas, perturbando de manera inmediata todo el ecosistema (flora y fauna) donde se produce el evento, sin embargo, al no ser atendido de manera rápida puede moverse a los ecosistemas costeros, que son los más productivos, afectando también, a las personas

que directamente viven de éstos, y aumentando su impacto en espacio y tiempo, dificultando su control y remediación.

En este sentido, Wang, Wang y He (2015), son precisos a describir lo siguiente:

> Los derrames petroleros se producen todos los días a nivel mundial y pueden ocurrir durante los procesos de explotación, almacenamiento, transporte, producción o el mismo consumo; causando graves daños al ambiente, salud y los recursos naturales. No obstante, es el transporte del crudo la principal fuente de contaminación debido a los derrames por hidrocarburos y el 60% de la producción mundial se traslada vía marítima. (p.198)

Una revisión histórica del portal electrónico oficial de la Fundación Internacional de derrames petroleros (ITOF por sus siglas en inglés, 2017), reporta:

> Las prácticas inadecuadas (sobrecarga de los tanqueros, falta de mantenimiento de éstos, accidentes de las operaciones navieras, entre otras), han ocasionado el derrame de 2,2 millones de toneladas por año aproximadamente en los mares, afectando los elementos abióticos (agua y nutrientes); bióticos (flora y fauna), socioeconómicos (pesca y turismo) de las comunidades y el entorno ambiental. También se afectan la salud (condiciones dermatológicas, respiratorias y gastrointestinales) de las personas expuestas a un derrame de gran magnitud, resultando incluso muy difícil determinar las consecuencias a largo plazo.

La Oficina de Administración de Información Energética de los Estados Unidos (EIA, por sus siglas en inglés, 2016), a través de su portal electrónico oficial, es definida como “la encargada de controlar y resguardar las rutas marítimas petroleras a nivel mundial. Dichas vías estratégicas son altamente transitadas, ya que las empresas transportan no sólo crudo sino una gran variedad de combustibles líquidos como diésel, gasolina, propano, combustible de aviones, etanol, entre otros, lo que aumenta la probabilidad de derrames con consecuencias fatales.”

Una teoría consolidada desde hace 25 años en la Geoquímica Orgánica del Petróleo sobre la complejidad de la caracterización del crudo la plantearon, Engel y Macko (1993), “una vez el crudo es sometido a una variedad de procesos de meteorización,

los efectos combinados de éstos modifican significativamente la composición química inicial del crudo". (p.3) Por consiguiente, al emplear instrumentales de análisis convencionales; las huellas características y los parámetros químicos que se observan están alterados, dificultando realizar la correlación del crudo con su fuente.

La caracterización de la composición fisicoquímica e identificación del posible origen, son las acciones críticas para la presentación de pruebas forenses confiables que garanticen exactitud y precisión en la investigación de derrames de crudos y la resolución de controversias relacionadas con el establecimiento de las responsabilidades. De manera que, deben evaluarse con herramientas analíticas que proporcionen mejor información con un amplio rango de estabilidad de su propiedad en el tiempo, aportando la confiabilidad y precisión necesaria en los datos que proporcionan para la resolución de casos de derrames petroleros marinos.

Según lo plantea Pisos (2011), "en Venezuela existen más de 20 leyes, normas y resoluciones nacionales vigentes, además de la suscripción a convenios internacionales en materia ambiental petrolera, sin embargo, no se cuenta con la estructura científica ambiental y herramientas tecnológicas en caso de posibles demandas". (p.10)

En la práctica, el país no cuenta con metodologías analíticas y aplicaciones técnicas actualizadas, en el diagnóstico y seguimiento de derrames petroleros marinos, dificultando así, la calidad de los estudios ambientales, las cuales permitirán establecer soluciones nacionales en el campo de la ciencia forense ambiental aplicada a las operaciones petroleras y así disminuir los costos asociados a la adquisición de tecnología foránea para la defensa de la empresa en caso de arbitrajes internacionales.

Esta serie de consideraciones planteadas anteriormente, permite establecer las siguientes preguntas de manera inmediata:

1. Sabiendo que el crudo al derramarse en ambientes marinos, producto de los procesos de meteorización, sufre variación significativa en su composición molecular inicial ¿Qué herramientas analíticas con metodologías y aplicaciones

técnicas actualizadas posee Venezuela, en el diagnóstico y monitoreo de derrames petroleros, que permitan establecer las huellas características de nuestro crudo exportado?

2. ¿Cuáles parámetros técnicos tiene Venezuela dentro de su normativa legal ambiental vigente, estandarizados con los convenios y leyes internacionales, en materia de diagnóstico y monitoreo ambiental, en caso de derrames petroleros en los sistemas marinos?

1.2. Objetivos de la Investigación

1.2.1. Objetivo general

Establecer el análisis isotópico de compuestos específicos de hidrocarburos en la fracción n-alcanos (CSIA), como una herramienta analítica en las ciencias forenses ambientales asociadas a derrames petroleros en sistemas marinos.

1.2.2. Objetivos específicos

1) Establecer la línea base (condiciones iniciales) del sistema marino donde se realizarán las pruebas de simulación de derrame petrolero.
2) Determinar la correlación entre parámetros analíticos robustos de la geoquímica orgánica convencional con los perfiles isotópicos del crudo a estudiar.
3) Evaluar las tendencias de los perfiles isotópicos del crudo, en función del tiempo de exposición, a la degradación microbiana.
4) Comparar las tendencias de los perfiles isotópicos de crudos, en función del tipo de crudo exportable venezolano con respecto a otros países.
5) Plantear un procedimiento general para la aplicabilidad de la herramienta forense de los CSIA en caso de derrames petroleros venezolanos en sistemas marinos.

1.3. Justificación e Importancia

La definición de las responsabilidades legales, políticas y económicas en un derrame petrolero, es evaluada a través del área de las ciencias forenses ambientales, con la caracterización del crudo derramado y la correlación con su posible origen. Esto plantea la necesidad del empleo de técnicas de análisis confiables y precisas, que combinados con una comprensión de la historia de los procesos de alteración a los que fue sometido el crudo, permite establecer con éxito el origen de la contaminación.

Aunque en Venezuela se ha avanzado en leyes y normativas en materia ambiental, existe obsolescencia en metodologías analíticas y aplicaciones técnicas actualizadas, para la evaluación de estudios ambientales en el área petrolera. En tal sentido, una de las técnicas que más importantes avances ha tenido en las últimas décadas, es la Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas de relaciones isotópicas (GC-IRMS, por sus siglas en ingles). Este instrumental, permite la determinación analítica de valores de los CSIA en mezclas complejas de interés geoquímico, ofreciendo la posibilidad de establecer huellas características de los crudos venezolanos.

El aporte de la presente investigación, desde el punto de vista científico académico, es la incorporación y actualización de conceptos ya consolidados en otras áreas de las ciencias, en cuanto a las aplicaciones de las relaciones isotópicas para caracterizar compuestos de matrices complejas.

1.4. Alcance

El presente trabajo está diseñado para establecer los CSIA, como una herramienta en la caracterización y correlación de los derrames de crudo con la fuente de contaminación en operaciones petroleras venezolanas en ambientes marinos. Además, de impulsar esta tecnología y sus aplicaciones técnicas en el campo de las ciencias forenses ambientales dentro del país.

El trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de la empresa PDVSA-Intevep, en la ciudad de Los Teques, estado Miranda, Venezuela, donde se realizaron las actividades del diseño y ejecución de las simulaciones a escala de laboratorio de derrames petroleros con crudo venezolano con calidad de exportación en sistemas marinos, toma de muestras y estudios analíticos (análisis químicos y geoquímicos convencionales y no convencionales), en un lapso estimado de veinticuatro (24) meses, para culminar con éxito el desarrollo de la investigación.

1.5. Consideraciones Éticas y Legales

Sampieri, Fernández-Collado y Baptista (2006), definen a la investigación como “un conjunto de procesos sistemáticos y empíricos que se aplican al estudio de un fenómeno; es dinámica, cambiante y evolutiva” (p.21). La investigación debe cumplir dos propósitos fundamentales: producir conocimientos y teorías; y resolver problemas prácticos. Es debido a esto, que la humanidad ha evolucionado. Los investigadores se preguntan permanentemente ¿Es útil y valiosa la información obtenida para la sociedad? ¿Ayudará a mejorar la vida del hombre, cuidar al ambiente y optimizar los recursos naturales?

En el particular, la investigación en el área de la Ingeniería Ambiental tiene como deber esforzarse en mejorar la calidad del medio físico, socioeconómico, urbano y de los espacios naturales para promover los principios del desarrollo sostenible (Código de Ética, Colegio de Ingenieros, 1996).

El patrimonio natural ambiental se está agotando para las nuevas generaciones y esto se evidencia diariamente. Lo que plantea, la profundización sobre el conocimiento de nuestras relaciones con el ambiente, para un mejor modo de acceso, gestión, participación y distribución de los bienes de producción y consumo, basado en el modelo de desarrollo sostenible.

La conciencia de la crisis ecológica tiene un sentido humanista, en una doble dimensión. La primera dimensión, es que todos los seres humanos dependemos de la naturaleza; la segunda, que sólo el ser humano, es capaz de cuidar de la naturaleza. Es en este punto, donde la ética entra a jugar un papel importante pues la crisis ecológica requiere de la toma de conciencia y de la solidaridad mundial. La situación ambiental actual es una cuestión de moral, pues se refiere a nuestro comportamiento respecto a nuestros semejantes actuales y los futuros, a nosotros mismos y al ambiente en el que habitamos.

En el ejercicio profesional, el compromiso debe obligar a vigilar cada acción, cada actitud y cada objetivo laboral, de manera que éstos estén orientados hacia una clara e inequívoca meta de reducir en lo posible nuestro impacto sobre ese desarrollo al cual se contribuye con nuestras acciones. Y si llegase a impactar, desarrollar las estrategias de respuestas inmediatas para solventar la situación.

El desarrollo de la investigación, va orientado a plantear soluciones metodológicas para controlar, de manera precisa y oportuna, posibles impactos ambientales de la industria petrolera nacional en espacios marinos; de esta manera cumplir con lo establecido en la Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo (1992), en el *principio de beneficencia*, ya que Venezuela como Estado, “tiene la obligación de hacer el bien al ambiente y actuar en interés del ambiente y del ser humano” (p.3); realizando todas aquellas acciones y actividades tecnológicas y científicas necesarias para revertir los

daños ocasionados a los ecosistemas. Otro principio que se enlaza directamente con el estudio, es el de *"quien contamina, paga*"; vinculado estrechamente con el de la responsabilidad, concebida como la indemnización en relación con las víctimas de la contaminación y otros perjuicios ambientales y diseñar aquellos instrumentos necesarios para revertir el daño causado.

Este estudio dentro del marco ético – legal de la investigación, se desarrolló conforme a los siguientes criterios:

Se realizó con la autorización de la empresa PDVSA - Intevep, con el consentimiento de la Gerencia Exploración y Yacimientos – Investigación Estratégica. Se respetó la propiedad intelectual y los derechos de los autores aquí citados, no se realizaron plagios de otros trabajos, sino que se atribuyeron las ideas propias creadas por un individuo y reconociendo las contribuciones a la ciencia que han realizado los mismos. Cuando se realizó el uso de alguna conclusión, método, estrategia o herramienta de prueba, se identificó claramente el autor de dicho aporte, ya sea individuo, organismo o empresa, y se empleó con propósitos netamente académicos.

Se realizó la comprobación de información de forma que el mismo no se generó conflictos de intereses con trabajos anteriores publicados.

De acuerdo con los principios establecidos en la Ley de Derechos de autor:

> De los derechos sobre las obras creadas bajo relación laboral o realizadas por encargo. Artículo 59.- Se presume, salvo pacto expreso en contrario, que los autores de las obras creadas bajo relación de trabajo o por encargo, han cedido al patrono o al comitente, según los casos, en forma ilimitada y por toda su duración, el derecho exclusivo de explotación definido en el artículo 23 y contenido en el Título II de esta Ley. La entrega de la obra al patrono o a quien encarga la creación, según corresponda, implica la autorización para que éstos puedan divulgarla, así como para ejercer los derechos a que se refieren los artículos 21 y 24 de esta Ley y la de defender los derechos morales, en cuanto sea necesario para la explotación de la obra.

CAPITULO 2

MARCO TEORICO

En este segundo capítulo, se explica e interpreta el problema de esta investigación desde un plano teórico. Se presentan un conjunto de proposiciones teóricas y conceptos en relación al estudio, para plantear la forma como se abordará el problema y los objetivos planteados. Dicho capítulo contiene los antecedentes de la investigación, las bases teóricas, contextuales y legales, además del sistema de variables con sus definiciones conceptuales y operacionales.

2.1. Antecedentes de la investigación

La caracterización de derrames petroleros, manchas negras, alquitranes y su correlación con las potenciales fuentes, se evalúan con técnicas analíticas, que combinada con una comprensión de la historia de los procesos, permite establecer con éxito el origen de la contaminación. Bayona, Domínguez y Albaigés (2015), efectuaron una revisión actualizada de los avances en las metodologías de análisis químicos para caracterización de derrames petroleros.

Algunos parámetros empleados para el establecimiento de las huellas características son: los patrones de distribución de los hidrocarburos a través de la técnica analítica GC-FID y el análisis de marcadores específicos o biológicos, conocidos como biomarcadores. Para las primeras etapas del derrame, estas técnicas de análisis son muy útiles, sin embargo, los procesos de evaporación, las primeras 6 a 12 horas después del derrame, pueden alterar la distribución de los parámetros en el crudo, modificando las huellas características de éste y, continua afectado severamente por la

biodegradación en el mediano plazo (semanas a meses) después de ocurrido el accidente.

El principal aporte de esta investigación, es evidenciar la necesidad de desarrollar métodos analíticos que permitan estudiar propiedades moleculares y atómicas, donde su principal característica sea la estabilidad en el tiempo a los procesos de alteración físicos, químicos y biológicos.

La determinación de la fuente del contaminante, y por ende, de las debidas responsabilidades de manera temprana, es importante debido a que, permite establecer el plan de contingencia que se activaría en el manejo del daño ecológico y humano, generados por los componentes del crudo. Bejarano y Michel (2013), evaluaron el riesgo a gran escala de la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en sedimentos costeros de Arabia Saudita. Los derrames petroleros intencionales durante todo el período de la guerra del Golfo Pérsico, se estimaron en unos 10,8 millones de barriles de petróleo. El crudo derramado se dispersó en el sistema marino desde el sur hasta el noroeste de la línea de costa saudí.

Los investigadores recolectaron 1679 muestras a lo largo de la costa saudí y analizaron la concentración y nivel de toxicidad de los PAH. La toxicidad de los sedimentos fue caracterizada usando la unidad de toxicidad de Benchmark ($ESBTU_{FCV,\ 43}$). El 65% de las muestras mostraron efectos ecológicos potencialmente adversos. De manera que las concentraciones de los PAH no son aceptables para la protección de la fauna bentónica de la zona.

Después de 20 años de la guerra del Golfo Pérsico y de los derrames intencionales, las costas de Arabia Saudita tiene concentraciones de PAH con altos niveles de toxicidad, los hábitats costeros aún no se recuperan y el gobierno saudí, al no poder establecer las responsabilidades por estas acciones, tuvo que asumir el compromiso, y ha diseñado e implementado estrategias de remediación, pero los altos costos han retrasado su aprobación y aplicación. La contribución de este estudio, es presentar el alto costo ambiental, social, político y económico de las comunidades afectadas por los derrames petroleros.

Por su parte, la Química Analítica, en la búsqueda de plantear soluciones a las diferentes áreas, ha logrado avances significativos en las últimas décadas, en técnicas de análisis químicos como la GC-IRMS. Esta técnica permite la determinación de relaciones isotópicas de carbono de los componentes individuales en mezclas complejas de interés geoquímico. Benson y otros (2012), compilaron las aplicaciones consolidadas de la GC-IRMS, además plantearon, que el rol principal de cualquier ciencia forense, es la determinación del delito cometido e identificación del responsable, por lo que debe estar respaldada con una variedad de análisis y exámenes de laboratorio.

Las diferentes técnicas analíticas convencionales empleadas por los científicos forenses, son: espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), fluorescencia de rayos X (FRX), microscopia electrónica de barrido acoplada con un detector de rayos X de energía dispersiva (MEB/EDX), difracción de rayos X (DRX), electroforesis capilar (EC), cromatografía iónica (CI), cromatografía liquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía liquida/espectrometría de masas (LC-MS) y finalmente, la cromatografía de gases (CG) acoplada con uno o más de los siguientes detectores: espectrometría de masas (MS), detector de captura electrónica (ECD), detector de ionización a llama (FID) o analizador de energía termal (TEA).

Sin embargo, establecen que aunque estas técnicas son muy precisas, en términos de la aplicación en las ciencias forenses, presentan limitaciones, porque las muestras recolectadas presentan alteraciones, y en ocasiones, no se logra distinguir entre diferentes fuentes de una misma sustancia. Sin embargo, los investigadores, destacan que la IRMS se ha posicionado como una técnica especial para analizar muchos materiales complejos, ya que tiene la propiedad de individualizar un rango de compuestos de interés forense.

Algunas de las áreas donde se han aplicado con éxito las relaciones isotópicas son: farmacología (autenticación y control de calidad de drogas), alimentaria (autenticación y control de calidad de alimentos y sus derivados), arqueología (establecer información de la alimentación prehistórica y estilo de vida), ciencias militares (con materiales

complejo como explosivos, drogas y terrorismo), ciencias biológicas (estudiar el comportamiento migratorio de especies), medicina forense (diagnóstico de enfermedades, autopsia y estudios antropológicos) y geoquímicas (en exploración y caracterización de yacimientos).

Esta revisión resalta diferentes áreas, en las que la IRMS ha funcionado como una técnica adicional para analizar con mayor resolución muchos materiales, ya que individualiza un rango de compuestos de interés forense.

El avance vertiginoso del estudio de las relaciones isotópicas, es debido a la incertidumbre generada en la caracterización convencional de los crudos derramados, de manera que, Hough y otros (2011), realizaron una evaluación preliminar de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ en el crudo total y los CSIA, como métodos alternativos para correlacionar la fuente con los compuestos de hidrocarburos en suelos contaminados de crudos altamente meteorizados. Diseñaron un experimento a escala de suelos (con material arenoso no carbonoso) y derramaron crudos. De estos experimentos recolectaron muestras del crudo periódicamente cada 24 horas durante 256 días y se determinaron los valores de $\delta^{13}C$ a través del empleo de GC-IRMS.

La biodegradación intensa causa cambios en la relación $^{13}C/^{12}C$ en el crudo, favoreciendo el enriquecimiento de ^{13}C en los n-alcanos residuales. Esto indica, que el uso de $\delta^{13}C$ en crudo total, no es una herramienta útil como parámetro de correlación de fuente en caso de crudos fuertemente degradados.

No obstante, en la relación isotópica de los compuestos específicos en n-alcanos, se observaron variaciones muy pequeñas o imperceptibles. Se mostró que la relación isotópica de los isoprenoides es la menos afectada por la biodegradación pudiendo plantearla como un parámetro de correlación para establecer la fuente de contaminación. La investigación contribuye en la elaboración del diseño experimental, aunque el sistema de este trabajo fue realizado en suelos, permite establecer un punto de partida para considerar ciertos factores para el desarrollo de este proyecto.

Una de las aplicaciones consolidadas y estudiadas, para los CSIA, desde hace 25 años con éxito, es en el área de exploración petrolera para establecer correlación entre crudo–crudo y crudo–roca fuente. Benson y otros (2012), recopilaron información fundamental y básica sobre la aplicación de los CSIA de n-alcanos en el área de exploración petrolera, especialmente de los últimos 25 años. Los autores plantearon que la GC-IRMS se ha aplicado con éxito en la caracterización de los componentes individuales específicos en la fracción saturada del crudo (CSIA- n alcanos), permitiendo establecer correlaciones crudo-crudo y crudo-roca fuente. Además, resaltan que antes del desarrollo de la aplicación de CSIA-n alcanos, los estudios geoquímicos complejos tenían limitaciones en la interpretación. Luego, en la década de los años 80 del siglo XX, la comunidad científica empezó a observar las tendencias de las relaciones isotópicas de las diferentes fracciones (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) de los crudos y relacionarlas con las posibles rocas fuentes, obteniéndose resultados exitosos y confiables en las investigaciones de la exploración.

Mazeas, Budzinski y Raymond (2008), estudiaron las relaciones isotópicas en n-alcanos en crudos biodegradados por actividad microbiana. Las tendencias isotópicas mostraron que valores isotópicos tenían un leve enriquecimiento en ^{13}C dependiendo del nivel de biodegradación. Los compuestos de bajo peso molecular (C_5 a C_9) presentaron los mayores niveles de enriquecimiento (>3‰). Mientras que, en los n-alcanos de mayor peso molecular (>C_{15}) se observan insignificantes variaciones que van en el orden de 0,5‰ (que está dentro del error de la técnica analítica), permitiendo usarlo de manera exitosa como huella característica exploratoria del crudo.

Estas investigaciones aportan la fundamentación conceptual que se ha logrado en la Geoquímica Orgánica del Petróleo, y que pudiese ser aplicada para comprender y establecer las relaciones isotópicas como técnica de análisis en materia de ciencia forense ambiental.

2.2. Fundamentos Teóricos

La revisión bibliográfica a seguir ha sido dividida en tres (3) aristas fundamentales del conocimiento científico, que permite estudiar el derrame o accidente petrolero como un fenómeno multifactorial complejo, dichas aristas están englobadas dentro de la Geoquímica como ciencia, específicamente: Forense Ambiental, Orgánica del petróleo e Isotópica.

2.2.1. Ciencia Forense Ambiental

2.2.1.1 Definición

Murphy (2008), define a las ciencias forenses ambientales como la aplicación de métodos científicos dirigidos a la identificación del origen, fuente y tiempo de un vertido o descarga de contaminantes al medio ambiente. Permitiendo, la reconstrucción de antiguos derrames y su relación con el destino y transporte de contaminantes liberados en el medio ambiente (p.6). Por lo tanto, considera el análisis sistemático de evidencia, información histórica y ambiental (que puede ser utilizada en el contexto de un proceso legal) para determinar el origen del suceso y responsabilidad asociadas. Este autor enfatiza que la adjudicación de responsabilidades, se vuelve más difícil cuando existen diferentes fuentes que podrían ser responsables por distintas liberaciones o descargas de sustancias (contaminantes) en el tiempo en un mismo sitio.

Básicamente, en las investigaciones forenses ambientales, el primer paso es caracterizar el lugar del derrame y el área afectada, para determinar la naturaleza y magnitud del problema e identificar posibles complicaciones a nivel de seguridad sanitaria. De manera, que tener una visión completa del problema se hace crítico

durante la investigación e implica definir la fuente, tipo, cantidad y la ubicación del crudo derramado, estos elementos básicos proporcionan el marco necesario para una evaluación de las variables ambientales del evento ocurrido.

De acuerdo a Wang y otros, (2007), existe una diferencia entre el comportamiento del crudo derramado en suelo y en agua, que viene determinada por la velocidad a la que el crudo se mueve o extiende y el tamaño resultante del área afectada. Tal comportamiento característico se desglosa en la tabla 1.

Tabla 1. Comportamiento característico de los derrames en suelo y agua (Fuente: Wang y otros, 2007 p.127)

Crudo en suelo	**Crudo en agua**
Se mueve lento o permanece estático.	Se mueve por el viento y/o corrientes de agua, permaneciendo en moviendo por días y en algunos casos hasta semanas.
Puede ser recolectado en las depresiones o valles o por barreras artificiales. En cuanto al tamaño de la zona afectada, puede ser de bajas dimensiones.	El tamaño del área afectada incrementa con el tiempo, y se dificulta su localización completa, ya que una proporción pudo haber sufrido evaporación, disolución o precipitación.
Solo el crudo liviano puede esparcirse hasta formar capas delgadas de crudo, y hasta estanques y charcos.	En la superficie del agua se dispersa para formar una gran capa continua de crudo.
La meteorización afecta lentamente al crudo luego de 24 horas del evento	La meteorización y emulsión son procesos dinámicos que continuamente alteran las propiedades físicas y químicas del crudo.

Los crudos derramados en suelos, fluyen por las pendientes y laderas, y por lo general se acumulan en las depresiones o barreras artificiales. La velocidad del crudo en la pendiente depende de la temperatura y viscosidad del crudo, ángulo de la pendiente, el estado físico de la superficie (rugosidad, tipo de vegetación, tipo de suelo, permeabilidad, entre otros). Las superficies del suelo por lo general son muy irregulares, por lo que el espesor de las capas de crudo varía considerablemente. Mientras que, el crudo derramado en agua, aumenta vertiginosamente su magnitud y la zona afectada, ya que, es transportado y difundido por las corrientes superficiales, llegando a las quebradas, ríos o directamente al mar, en corto periodo de tiempo.

Wang y otros (2007), establecen que las características principales que se deben evaluar en las ciencias forenses en un sitio afectado (suelo o agua), para la caracterización y su reconocimiento son:

a) Definición de las condiciones del sitio que influyen en la persistencia y trayectoria del crudo derramado.
b) Delimitación de las áreas afectadas por el derrame.
c) Identificación de los antecedentes y de las contribuciones específicas del crudo en el área afectada.
d) Descripción de las variaciones en las características físicas, concentración y modo de ocurrencia en el espacio y tiempo.
e) Evaluación de la variabilidad de las concentraciones del crudo y la profundidad de penetración del mismo.
f) Adquisición de datos técnicos para ayudar al pronóstico en el tiempo de residencia en superficie y subsuelo del crudo, a partir del conocimiento de los procesos de alteración como la meteorización, entre otros.
g) Acceso a los datos para la comprensión de los efectos al corto y largo plazo del uso de los recursos afectados por el derrame.

Para cumplir a cabalidad esto, es fundamental contar con técnicas de análisis químicos y físicos para recabar datos de manera más precisa y confiable para la comprensión de los hechos ocurridos.

2.2.1.2. Accidentes o derrames petroleros

Celis (2009), define el derrame de sustancias nocivas, como “un evento en el cual se libera del contenedor sustancias nocivas en cantidades que representen peligro” (p.22). Por su parte, Zamora, Ramos y Arias (2012), precisan al derrame petrolero como “un vertido que se produce debido a un accidente o práctica inadecuada dentro de cualquier proceso de la cadena de petrolero, que contamina el medio ambiente”. (p. 5)

Celis (2009), plantea que “la contaminación por petróleo o por sus productos refinados (diésel, gasolina, kerosen y otros productos) es generada accidental o deliberadamente desde diferentes fuentes” (p.23). La contaminación por petróleo en sistemas marinos proviene de los accidentes de los buques tanques en las rutas marítimas de transporte y de las fugas en los equipos de perforación marina. Otra posible fuente de contaminación proviene de tierra firme, del que es arrojado al suelo en las ciudades y en zonas industriales, que luego son arrastrados por las corrientes fluviales hasta llegar a los océanos.

2.2.1.3. Fuentes de contaminación por hidrocarburos en el mar

A consecuencia del desarrollo de la industria petrolera, el transporte marítimo se ha incrementado en forma considerable, y con ello se intensifican los problemas de la seguridad y el riesgo de dañar el medio marino. Los accidentes de contaminación tanto en tierra como en los cuerpos de agua resultan inevitables, debido a los grandes volúmenes de hidrocarburos que se manejan. El transporte marítimo, es considerado el causante principal de contaminación (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las fuentes de hidrocarburos al medio marino (Fuente: Zamora, Ramos y Arias, 2012, p. 10)

Origen / Tipo	Accidental	Operacional	Natural
Terrestre	Roturas / accidentes: - Industrias - Refinerías - Oleoductos - Puertos	Efluentes: - urbanos - industriales - agrícolas	Afloramientos
Marino	Transporte marítimo Extracción en *offshore*	Puntuales: - cargas - lavado Crónicos: - perdidas de aceites	Afloramientos en la corteza oceánica
Atmosférico	Productos de la combustión industrial	Efluentes: - lavados - lluvias en zonas urbanas	Emanaciones de gases

Zamora, Ramos y Arias (2012), clasifican la contaminación por hidrocarburos según dos tipos de criterios: su origen y la causa del mismo, tal cual se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de la contaminación por hidrocarburos (Fuente: Zamora, Ramos y Arias, 2012, p.14)

Criterios	Características
Origen	- Terrestre: debido a actividades humanas ligadas con el medio costero. - Marítimo: debido al transporte y a las instalaciones en mar abierto. - Atmosférico: aporte de ciertos compuestos suspendidos en la atmosfera que son transportados por precipitaciones.
Causas	- Accidental: representa un suceso puntual, tanto en el espacio como en el tiempo, presumiblemente evitable e involuntario. - Operacional: o consecuencia directa del conjunto de actividades humanas que intervienen en el medio, con una cierta intencionalidad. - Natural: impredecibles expresiones o emanaciones en yacimientos naturales.

2.2.1.4. Procesos de alteración en hidrocarburos en el medio marino. Factores que afectan la huella química del crudo

Wang, Wang y He (2015), describen los efectos de los cambios en la composición química de crudos derramados en términos de sus efectos en la “huella característica” del crudo. Estos factores pueden agruparse en dos escenarios: antes y después del derrame, donde el primero está influenciado por el origen, ya sea del crudo o sus productos refinados; y el segundo, ocasionado por los procesos de alteración ambiental como la meteorización y mezclas que influyen en las huellas químicas del crudo que

son relevantes a considerar en las investigaciones de los derrames. Tal cual se esquematiza en la figura 1.

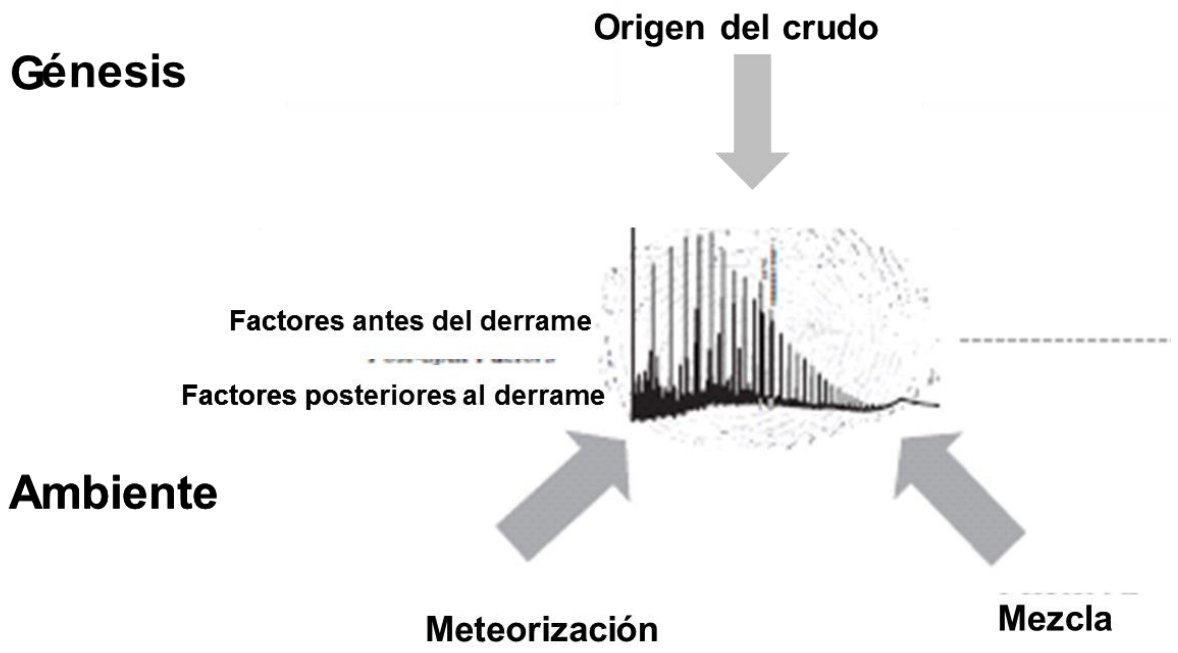

Figura 1. Diagrama que representa los tres (3) factores relevantes que afectan las huellas químicas del crudo en una investigación forense (Fuente: Wang, Wang y He, 2015, p. 33)

Esta investigación se centra en la meteorización y los procesos asociados a ésta. El petróleo una vez entra en contacto con el agua, es sometido inmediatamente a múltiples procesos que son químicos, físicos y biológicos, y que en conjunto, se conocen como meteorización. La magnitud de la contaminación por petróleo depende de varios factores: tipos de hidrocarburos (crudo o refinado), cantidad liberada, distancia del sitio de liberación desde la playa, época del año, temperatura del agua, clima y corrientes oceánicas.

Echarri (2005) explica que:

Cuando se vierte petróleo en el mar, la mancha negra se extiende en una superficie cada vez mayor hasta llegar a formar una capa muy extensa, de un espesor muy delgado. Se estima que en el transcurso de 1½ horas, 1 m^3 de petróleo puede llegar a formar una mancha de 100 m de diámetro y 0,1 mm de espesor. Una vez derramado al medio marino, los hidrocarburos empiezan a transformarse, sus propiedades fisicoquímicas evolucionan a lo largo del tiempo, proceso conocido como envejecimiento o degradación. Al entrar en contacto con el agua, los componentes de bajo peso molecular, se evaporan. Una gran parte del petróleo (sobre el 60%) se evapora en las primeras horas después del vertido.

El petróleo evaporado es descompuesto por foto-oxidación en la atmósfera de manera continua y parte del crudo remanente es disuelto en el agua, siendo uno de los pasivos ambientales más peligrosos. Del resto del vertido que queda en el agua, una parte sufre dispersión vertical, disolviéndose en la columna de agua inferior a la capa del vertido debido principalmente al efecto de las olas rompientes, las pequeñas gotas oleosas dispersas tienden a volver a la superficie y ser dispersadas por las fuerzas de flotabilidad. Las gotas más grandes emergen enseguida, mientras que las gotas más pequeñas pueden ser transportadas por las corrientes lejos del lugar del derrame y permanecen dispersas durante semanas, provocando contaminación a kilómetros de distancia del punto del accidente.

Lo que queda forma una emulsión gelatinosa de agua y aceite que se convierte en bolas de alquitrán densas, semisólidas. Las condiciones de viento y la viscosidad del hidrocarburo son los factores más importantes para la formación de emulsiones, que pueden llevar a que el volumen de la emulsión cinco días después del derrame sea el doble del volumen derramado. Los vertidos de hidrocarburos también son afectados por la biodegradación, proceso extremadamente lento pero importante a largo plazo (p. 2). Tal como se puede observar en la figura 2.

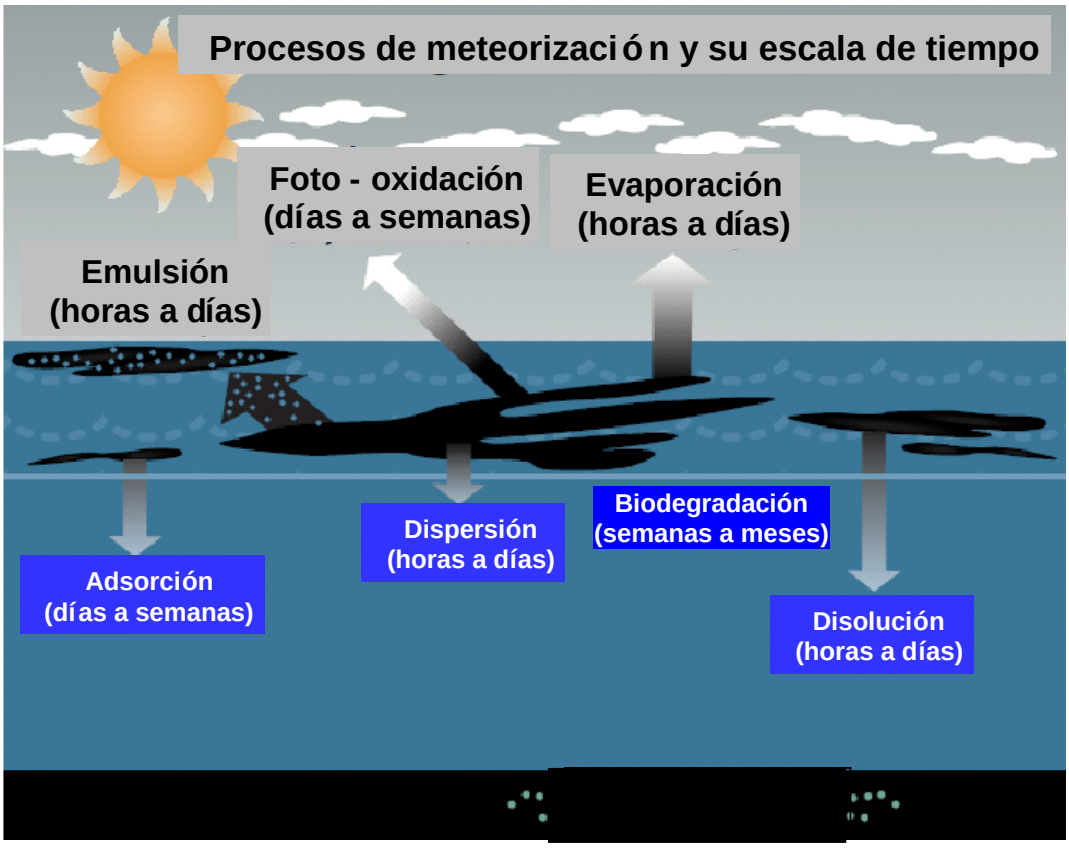

Figura 2. Principales procesos de envejecimiento de los hidrocarburos y sus escalas temporales (Fuente: Echarri, 2005, p.6)

Zhendi y Stout (2007), definen la meteorización o intemperización como la pérdida de ciertos componentes del petróleo a través de una serie de procesos naturales que comienzan una vez que ocurre el derrame y continúan indefinidamente. La tasa de intemperización del crudo varía en función de las características del producto derramado y de las condiciones climáticas existentes en el lugar del derrame. A continuación, se describen los procesos más relevantes: dispersión horizontal, evaporación, disolución, biodegradación, foto-oxidación, emulsificación, dispersión vertical y enriquecimiento de ceras.

- Dispersión horizontal: Explica Wang y otros (2007), que cuando un líquido más ligero es derramado sobre otro, se produce este proceso natural y espontáneo,

causado por una serie de fenómenos fisicoquímicos. Tras el vertido de hidrocarburos al mar, estos productos se dispersan rápidamente en la superficie, pudiendo llegar a abarcar áreas muy extensas incluso en condiciones de calma. Esto es debido a un desequilibrio de fuerzas internas y externas llamado dispersión mecánica. Lleva este nombre para distinguirlo de los procesos de extensión difusiva. El proceso de dispersión evoluciona temporalmente hasta llegar a un estado en el cual el espesor de la capa llega al denominado espesor mínimo a partir del cual, la dispersión mecánica cesa. Este espesor es característico de cada producto que depende de su viscosidad y de su densidad.

Una vez alcanzado el espesor mínimo, debido a los procesos propios de envejecimiento o por una fuerte turbulencia del medio, la mancha en superficie se puede fragmentar en pequeñas manchas discontinuas. Este fenómeno tiene una relevancia en mar abierto y es el principal fenómeno de expansión en aguas que están siendo remediados, ya que el espesor mínimo se puede alcanzar en menos de un día (p.28).

- Evaporación: Wang y otros (2007), lo describen como el proceso que más afecta la composición química de la huella del crudo, en las primeras horas del derrame. La tasa de evaporación depende de múltiples factores, pero en general, compuestos con puntos de ebullición por debajo de los 200ºC, se evaporan dentro de un período de 24 horas. La reducción de masa atribuible a la pérdida por evaporación dependerá de la composición del crudo derramado. (p. 31)

La evaporación empieza inminentemente tras el derrame, prolongándose desde unas pocas horas a unos cuantos días según el producto. El porcentaje de eliminación del volumen derramado (tasa de evaporación) es un aspecto que también depende del tipo de hidrocarburo, este porcentaje alcanza un máximo (tasa máxima de evaporación) que oscila entre el 100% en los productos más ligeros y apenas el 10% para los productos pesados.

El viento en la superficie, la temperatura y la radicación solar también son agentes que alteran la velocidad con la que el producto derramado se evapora. A mayor

temperatura más rápidamente se alcanza la tasa máxima de evaporación y a mayor viento, mayor efecto de arrastre, mayor transferencia de masa fluido-gas y por lo tanto mayor velocidad de evaporación.

En la figura 3, Stout (2009), muestran los efectos de la evaporación en un crudo derramado de 34°API, luego de la fractura estructural de un tanque de almacenamiento sobre suelo, durante el huracán Katrina (EEUU). En el cromatograma A, se observa el crudo recuperado del interior del tanque, el cual está ligeramente evaporado en los compuestos <n-C_{14}.

En el cromatograma B, muestra el crudo recolectado en el suelo, aproximadamente dos semanas después del derrame. En este instante, el crudo ha experimentado pérdida por evaporación en los compuestos <n-C_{19}, lo que resulta en un aumento relativo del material carbonoso irresoluble (UCM por sus siglas en inglés).

Finalmente, en el cromatograma C, se muestra un crudo recolectado en los sellos de una “piscina recolectora” al lado del edificio del tanque, aproximadamente dos semanas después del derrame. Este residuo de crudo experimentó pérdida evaporativa de la mayoría de los compuestos <n-C_{20}. (p.114)

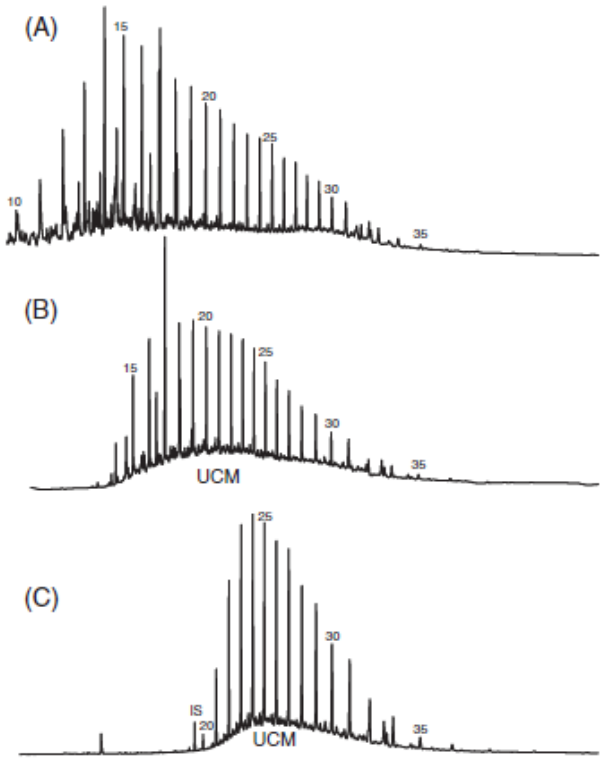

Figura 3. Cromatogramas GC-FID, donde se aprecia la pérdida progresiva de compuestos en un crudo de 34°API derramado durante el huracán Katrina en EEUU. En el (A) está el crudo levemente evaporado, (B) moderadamente evaporado y (C) severamente evaporado (Fuente Stout, 2009, p. 115)

Puntualizan, Zhendi y Stout (2007), que crudos livianos o de alta gravedad API, pueden evaporarse casi completamente, y que la mayoría de los crudos livianos o medianos pudiesen perder entre 10 y 50% de su masa, producto del efecto evaporativo en los primeros días del derrame.

- <u>Disolución:</u> Este proceso es aquel por el cual las fracciones solubles del hidrocarburo se disuelven en el volumen de la columna de agua y en los alrededores del derrame. El tiempo de disolución depende de la composición, tasa de esparcimiento, temperatura del agua, turbulencia y grado de dispersión. (p.33). Aunque

el proceso comienza inmediatamente, se manifiesta de manera más significativa a largo plazo y continua durante todo el proceso de degradación del hidrocarburo. Los compuestos más ligeros son los más solubles en el agua marina y por lo tanto los que pueden aumentar la toxicidad del medio acuoso con mayor rapidez, ya que son los que se incorporan a la columna de agua de manera inmediata. El porcentaje de eliminación del volumen derramado en esta degradación suele ser poco importante (<5%) o incluso inexistente en función de la presencia de fracción soluble.

Zhendi y Stout (2007), explican que ocurre simultáneamente con la evaporación, lo que genera dificultad para distinguirlos, estimando que la disolución puede reducir la masa del crudo en 1 a 3%. Además, indican que los estudios han demostrado que la evaporación domina claramente la pérdida, por lo tanto, la disolución es relativamente insignificante en comparación con la evaporación. Sin embargo, la comprensión de este proceso, puede ser importante en el reconocimiento del impacto del crudo en la biota afectada.

- Biodegradación: Es un proceso natural en el cual los microorganismos descomponen los hidrocarburos en compuestos más sencillos. El crudo es un producto que se encuentra en forma natural en el medio, es normal que ciertas especies de bacterias marinas, hongos y otros organismos sean capaces de descomponer los hidrocarburos para utilizarlos como fuente de alimento. Es un proceso natural muy lento debido al agotamiento continuo de oxígeno y nutrientes, a la formación de emulsiones de agua y crudo y puede estar limitada por la presencia en el producto de compuestos tóxicos. La tasa de biodegradación depende del contenido de nutrientes (nitrógeno y fosforo), oxígeno disuelto, salinidad, área superficial del derrame y de la composición y tamaño de la población microbiana. En condiciones óptimas de aguas oxigenadas y con temperaturas entre 20 y 30°C, las bacterias pueden descomponer hasta 2,0 g/m^2 de crudo por día. (p. 36)

Existen diversas técnicas para potenciar y favorecer esta degradación, la más usual es añadir artificialmente nutrientes para las bacterias. Como regla general, el porcentaje

de eliminación del volumen derramado en esta degradación va desde el 50% para productos ligeros a apenas un 5% para productos pesados.

Murphy (2008), explica que la tasa de pérdida de masa debido a la biodegradación es mucho más lenta que la de los otros procesos, sin embargo, es el proceso que en el tiempo es más permanente. Además, plantean que, en el reconocimiento y monitoreo de los efectos de la biodegradación en crudos convencionales, se puede observar el agotamiento relativo de los n-alcanos, lo que hace compleja la identificación del crudo por métodos convencionales de análisis. (p. 38)

Los efectos de la biodegradación en la huella química del crudo derramado no son tan evidentes en el corto plazo luego de producido el evento, y que al igual que los otros procesos de meteorización, su comportamiento dependerá de la naturaleza del crudo y de las condiciones del derrame.

Prince y otros (2003), presentan ejemplos de casos reales de los efectos de la biodegradación del crudo y productos refinados luego de ser derramados en el ambiente. A finales de 1999, durante la tormenta Erika, se derramaron cerca de la costa francesa aproximadamente 19.000 toneladas de crudo pesado, llegando a todo lo ancho y largo de la costa. Una muestra de crudo fue recolectada en la costa de Le Croisic, cuatro (4) meses después del derrame, y se evaluó la pérdida de hidrocarburos por comparación de concentración de analitos con la concentración de un marcador interno natural conservativo del crudo, el 17α(H)21β(H) hopano. Al menos el 20% de este compuesto se había perdido en estos 4 meses.

Zhendi y Stout (2007), definen a los esteranos y triterpanos como los biomarcadores más útiles para la caracterización convencional de los derrames petrolero, ya que son considerados extremadamente resistentes a la degradación microbiana. Sin embargo, si el proceso de degradación es prolongado pueden llegar a sufrir modificaciones estos marcadores.

- <u>Foto-oxidación</u>: La radiación solar produce la oxidación fotoquímica, dependiendo de la intensidad de la radiación solar. Esta acción altera las propiedades fisicoquímicas de los productos petroleros modificando su estructura química. La

combinación química de hidrocarburos con el oxígeno atmosférico, contribuye a la descomposición o degradación final del petróleo. Cuanta más área expuesta exista, mayores serán la oxidación y la velocidad de foto oxidación. Este proceso es lento puesto que sólo una pequeña cantidad de oxigeno puede penetrar en una mancha de petróleo. (p.39)

Prince y otros (2003), explican que la exposición del crudo derramado y de sus productos refinados a la radiación solar conduce a varios radicales libres a reacciones de foto-oxigenación que producen una variedad de compuestos oxigenados, tales como los peróxidos, aldehídos, cetonas, alcoholes, carbonilos, sulfóxidos, epóxidos y ácidos grasos. (p.112). De manera que, al ser estos compuestos polares, son más solubles que sus compuestos parentales. Los compuestos de mayor peso molecular fotosensibles, pueden formar enlaces cruzados, haciéndose cada vez más grandes e insolubles, y a su vez, hace el crudo derramado más viscoso. La tasa de foto-oxidación del crudo está directamente relacionada a la intensidad de la radiación ultravioleta de los rayos solares.

La foto-oxidación y biodegradación son los dos procesos naturales que destruyen los hidrocarburos del crudo, produciendo nuevos compuestos que son más peligrosos que sus parentales.

- <u>Emulsificación:</u> este es el proceso por el cual un líquido se dispersa en otro líquido en forma de pequeñas gotas como una suspensión. En el caso de los hidrocarburos existen dos (2) tipos:

a.) Crudo en agua: puede ser fácilmente dispersas por las corrientes y la agitación superficial. La formación natural de estas emulsiones resulta muy positiva debido a que acelera los procesos de disolución, foto-oxidación y biodegradación.

b.) Agua en crudo: se forma cuando se mezcla agua con crudo viscoso o asfaltico por acción de las olas. Es muy estable y puede durar meses o años.

Zhendi y Stout (2007), esbozan que entre los procesos de la meteorización, la formación de emulsiones, es el único que promueve la persistencia del crudo en la superficie del agua y en la línea costera. Las emulsiones de largo tiempo forman una

capa de material de asfaltenos oxidado, que inhibe la evaporación, disolución, foto-oxidación y biodegradación del crudo. De tal manera que, la huella química del crudo emulsificado se preserva mejor comparada con un crudo no emulsificado. Por lo tanto, depósitos de emulsiones, alquitrán y material asfáltico en las líneas de costa pueden retener algunos hidrocarburos volátiles y compuestos biodegradables por un largo período de tiempo.

Este proceso afecta a los productos pesados y es inexistente en productos ligero. El nuevo producto (agua crudo) tendrá mayor densidad que la inicial, su viscosidad se verá aumentada drásticamente y será más inalterable frente a efectos externos. En el contexto de un suceso de vertido de hidrocarburo en el mar, este proceso se considera crítico en cuanto a su recuperación se refiere, ya que si la viscosidad del producto aumenta excesivamente, el bombeo resulta imposible.

En ciertos casos, se alcanzan proporciones de agua en la mezcla de hasta el 80%, llegando a multiplicar el volumen de contaminante, resultando más resistentes a los de procesos de biodegradación y por lo tanto, esta estabilidad lo hace más perjudicial al medio ambiente. Otro factor a tener en cuenta es que la mezcla emulsionada de agua y crudo, en su desplazamiento superficial por el mar, va incorporando todo tipo de partículas, objetos y sedimentos hasta llegar a la costa, donde se acaba mezclando con la arena de costa. Así, desde que el hidrocarburo se vierte hasta que se recupera en la costa, el residuo puede llegar a multiplicar su volumen por diez.

Si la emulsión preservada continua expuesta al aire y la luz solar, la meteorización tendrá una tasa muy lenta, convirtiendo al depósito de crudo en una capa asfáltica que se conoce como "*tar mat*", que puede ser extremadamente persistente y retener muchas de las características primarias y secundarias del crudo derramado por un largo período de tiempo. Los *tar mats* se vuelven frágiles con el tiempo, y la acción de las olas erosiona partículas impregnadas de crudo en la superficie de la costa, formando las esferas asfálticas conocidas como "*tar balls*". Los centros de las *tar balls* pueden contener crudos casi inalterados, semanas o meses después de ocurrido el derrame, proporcionando muestras de interés para obtener huellas químicas con poco efecto de la biodegradación.

- Dispersión vertical: Se trata de la penetración en forma particulada del contaminante en la columna de agua, formando lo que sería una emulsión de crudo en agua. Esta intrusión se realiza a partir del fraccionamiento de la capa superficial del contaminante en partículas de diferentes tamaños que serán dispersadas en la columna gracias a la turbulencia del océano y a las corrientes marinas (Prince y otros, 2003, p. 42). Este proceso puede llegar a ser muy importante, ya que, en ciertos casos el volumen dispersado en la columna de agua puede llegar a ser del 60%.

El petróleo y sus derivados son generalmente más ligeros que el agua marina, siendo además inmiscibles. Debido a la flotabilidad de las gotas del petróleo, éstas pueden remontar a la superficie, concentrándose de nuevo en la mancha original o formando una nueva. De esta forma, la evolución de la forma de dispersión en la columna de agua dependerá fundamentalmente de la turbulencia del medio y de la densidad del producto.

El proceso de dispersión puede producirse de forma natural, debido a la turbulencia del oleaje, o de forma inducida, debido a la utilización de productos químicos que favorecen la generación y estabilización de partículas más pequeñas. Este proceso ha generado controversia en la historia de la gestión de vertidos, ya que a raíz de la intervención y control de la contaminación producida por ciertos accidentes, se limitó el uso de ciertos productos químicos, ya que tenían mayor toxicidad que el producto derramado inicialmente, poniendo en juego la conservación del medio marino.

Estudios experimentales sobre dispersión vertical en el océano realizados por Zamora, Ramos y Arias (2012), determinaron que la intrusión de partículas de petróleo venía dado por su relación con parámetros tales como la temperatura, la viscosidad del petróleo, el espesor de la mancha superficial y las condiciones de turbulencia. Es un tema de actualidad el hecho de que se puede producir un vertido en profundidad de algún producto petrolero en lugar de en superficie. Este es el caso del dramático accidente que ha tenido lugar de la plataforma petrolífera de *British Petrol* (BP) en el golfo de México en 2010 en el cual, accidentalmente están accediendo a la columna de agua productos del yacimiento. En estos casos, por un lado el producto derramado se

mezcla instantáneamente con el agua circundante generándose nuevos compuestos y por otro, lado, la evolución del afloramiento es más difícil de evaluar.

- Enriquecimiento de ceras: Zhendi y Stout (2007), exponen que los crudos que contienen altas concentraciones de n-alcanos, son propensos a que éstos precipiten cuando el crudo es derramado (p.45).

Este fenómeno puede impartir heterogeneidad en la huella química del crudo, ya que se presenta una reducción en la abundancia relativa de n-alcanos >*n*-C_{20} en el crudo remanente (empobrecidas en ceras), igualmente en la fracción que precipita (enriquecidas en ceras) se observa un incremento en la abundancia relativa de n-alcanos >*n*-C_{20}. En la figura 4, se presenta un crudo parafínico del mar del Norte antes del derrame (cromatograma A), el crudo remanente (empobrecidas en ceras) en el cromatograma B y la fracción que precipita (enriquecidas en ceras) en el cromatograma C. Destacándose, que después de la simulación de un derrame controlado a 30°c durante 71 horas, las variaciones en las huellas características de los crudos derramados son muy marcados y se debe tener cuidado en su aplicación durante una investigación o pesquisa para correlacionar el crudo derramado con su fuente.

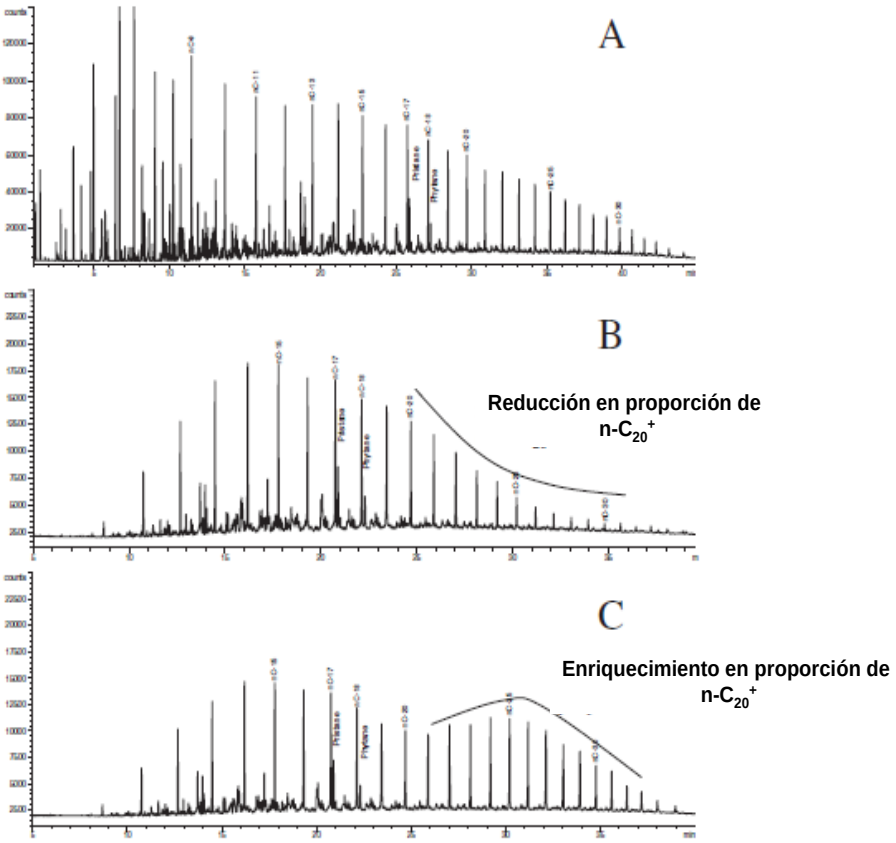

Figura 4. Cromatogramas GC-FID muestran los efectos de la precipitación de ceras en las huellas químicas de un crudo parafínico. (A) crudo iniciando precipitación. (B) fracción de cera empobrecida dentro del crudo derramado, 71 horas después del derrame. (C) Fracción de cera enriquecida dentro del crudo derramado, 72 horas después del derrame (Zhendi y Stout, 2007, p. 48)

2.2.1.5. Rutas marítimas internacionales de transporte de hidrocarburos

Revisando las rutas marítimas transitadas por los navíos petroleros alrededor del planeta, se puede encontrar que la Oficina de Administración de Información Energética de los Estados Unidos (EIA, por sus siglas en ingles), a través de su portal electrónico oficial, explica que su función principal es “ser la encargada de controlar y resguardar las rutas marítimas petroleras a nivel mundial, además dichas rutas están

establecidas a través de acuerdos y convenios internacionales firmados por los países". En la figura 5, se presenta el mapa mundial de las vías o rutas marítimas establecidas por la EIA para el transporte de combustibles fósiles y sus derivados.

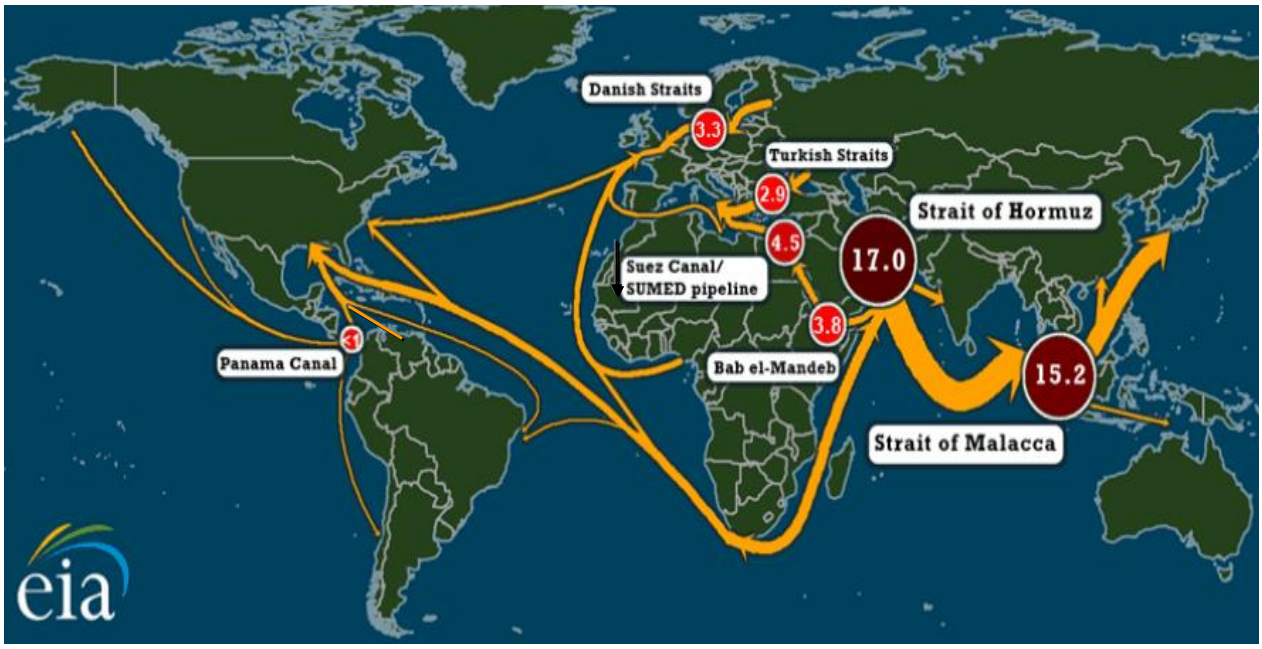

Figura 5. Rutas marítimas internacionales para el transporte de combustibles fósiles (Fuente: EIA, 2016)

Para proceder al transporte, almacenamiento y venta de los grandes volúmenes de petróleo bruto, como de los derivados, hoy en día se usan generalmente tanqueros, buques y supertanqueros, por sus facilidades en vías marítimas establecidas. De acuerdo a la EIA (2016) "estas vías estratégicas son altamente transitadas, ya que las empresas transportan no solo crudo sino una gran variedad de combustibles líquidos como diésel, gasolina, propano, combustible de aviones, etanol, entre otros, lo que aumenta la probabilidad de derrames con consecuencias fatales."

Esta alta de probabilidad de ocurrencia de accidentes o derrames petroleros, obligan a los países exportadores, a tener técnicas de análisis y herramientas para la caracterización de la composición química e identificación del posible origen, como las

acciones críticas para la presentación de pruebas forenses en la investigación de derrames de crudos y la resolución de controversias relacionadas con el establecimiento de las responsabilidades. De manera que, deben evaluarse con herramientas que proporcionen la confiabilidad y precisión de los datos en la resolución de casos de derrames petroleros.

2.2.1.6. Métodos de análisis convencionales empleados en derrames petroleros

Zhendi y Stout (2007), exponen que la exploración de hidrocarburos y las ciencias forenses ambientales pueden parecer dos temas muy diferentes, pero en muchos aspectos están estrechamente relacionados. Las técnicas de análisis que se han desarrollado y utilizado en la exploración y explotación en la industria petrolera desde hace más de tres décadas se han comenzado a aplicar en el área de las ciencias forenses ambientales en los últimos diez años. (p. 243)

Mientras que, la exploración de hidrocarburos se orienta hacia la búsqueda de nuevos recursos, las ciencias forenses ambientales están dirigidas a observar que ocurre con estos recursos encontrados o de los productos derivados de ellos, cuando son derramados accidental o incidentalmente en el ambiente.

La exploración emplea técnicas analíticas sofisticadas para correlacionar crudos o gases con su posible fuente y las ciencias forenses correlaciona los productos derramados con la fuente sospechosa, que puede ser un buque tanque, una tubería, un tanque de almacenamiento subterráneo, entre otros.

A continuación, se presentan las metodologías analíticas convencionales empleadas para la caracterización química del crudo derramado.

- Biomarcadores o marcadores biológicos

La comparación de las huellas características de biomarcadores es ampliamente usada para la correlación y diferenciación en las ciencias forenses ambientales. Los patrones de distribución de biomarcadores son, en general, diferentes para cada crudo y para los productos refinados de diferentes orígenes (Barakat, Mostafa, Rullkotter y Rahman, 1999; Bence, Kvenvolden y Kennicutt, 1996).

También las comparaciones cualitativas y cuantitativas de la distribución de los biomarcadores son concluyentes para la identificación del derrame y su fuente, en casos como: (1) relación entre crudo derramado – fuente: los biomarcadores estudiados son detectados en muestras recolectadas del derrame y pueden ser comparadas con fuentes potenciales de contaminación; (2) relación entre los crudos derramados: la distribución de patrones de biomarcadores coinciden entre ellos.

En la mayoría de los casos, la coincidencia o no en la distribución de biomarcadores, es una fuerte evidencia para la correlación positiva o negativa del crudo derramado y las fuentes potenciales. Sin embargo, lo expuesto anteriormente no es concluyente, debido a que, en las zonas de meteorización, los patrones de distribución se modifican perdiendo su información original, haciendo más difícil la correlación y generando la necesidad del uso de otras herramientas.

En general, los biomarcadores retienen una gran información del crudo original, y esta similitud estructural revela información bien específica sobre la fuente del crudo derramado. Por lo tanto, las huellas características químicas de la fuente y de los biomarcadores persistentes a la meteorización, generan o proporcionan información de gran importancia para las investigaciones forenses ambientales para determinar la fuente, diferenciar y correlacionar crudos. Además, hacer seguimiento de los procesos de degradación y estado de meteorización de los crudos.

A continuación se presenta en la figura 6, los cromatogramas de m/z=191 para un crudo derramado y algunos crudos (potenciales fuentes) producidos en dos plataformas cercanas al derrame.

Las diferencias relativas en la abundancia de biomarcadores como gammacerano (biomarcador aromático que permite inferir condiciones paleoambientalde de sedimentación) fueron suficientes para distinguir genéticamente entre los crudos y la posible fuente.

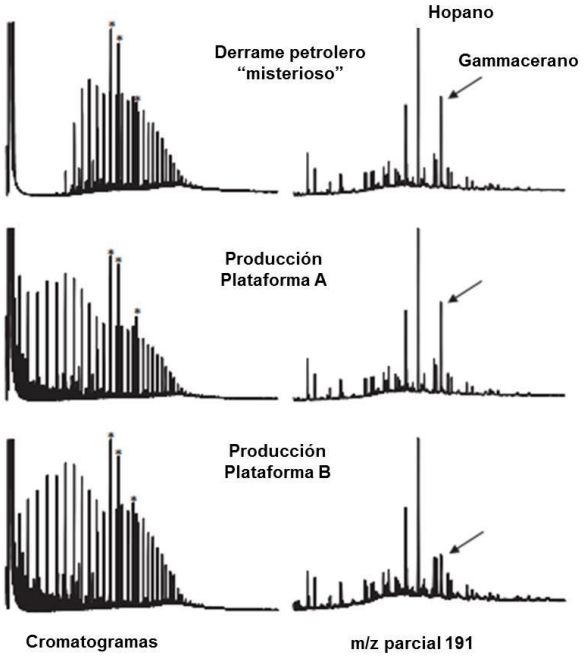

Figura 6. Cromatogramas GC-FID y GC-MS (m/z=191) para un crudo derramado y dos crudos provenientes de dos plataformas cercanas al derrame. (Fuente: Zhendi y Stout, 2007, p. 210)

Sin embargo, en crudos derramados que han sufrido meteorización severa, se pierde información en la composición química original, lo que presenta una limitación para las técnicas cromatográficas en el momento de definir o precisar el origen (Figura 7).

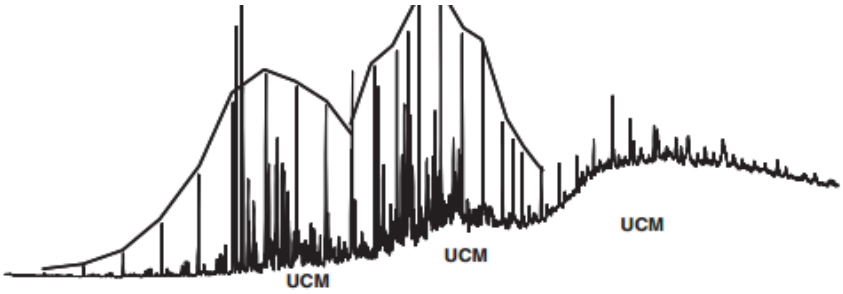

Figura 7. GC-FID de un crudo derramado que ha sufrido meteorización. (Fuente: Zhendi y Stout, 2007)

- Caracterización de los compuestos policíclicos aromáticos y de azufre aromáticos policíclicos (PAC y PASH, respectivamente por sus siglas en ingles)

Bence, Kvenvolden y Kennicutt (1996), detallan que los compuestos empleados como marcadores de la contaminación de crudo deben cumplir los siguientes criterios: 1) estar presente en todos los crudos, independiente de la fuente, 2) en cantidades suficientes que pueda ser analizada en caso de contaminación especialmente a bajas concentraciones, 3) mostrar estabilidad en el ambiente y 4) no tener aportes significativos por el entorno. Los compuestos aromáticos policíclicos son relativamente estables y constituyentes diagnóstico del crudo.

Diversos estudios se han realizado usando la distribución de los homólogos aromáticos policíclicos alquilados como indicadores ambientales y marcadores específicos de fuente de derrames petroleros. Los PASH cumplen con los criterios mencionados anteriormente a un alto grado, por lo que su uso como marcador orgánico se ha sugerido. Se han encontrado trazas en muestras ambientales muchos años después de un evento de derrame, lo que testifica su alta estabilidad (Reddy y otros, 2002).

Es importante que este parámetro sea usado en conjunto a otros marcadores, con el fin de establecer las pruebas forenses analíticas. De manera que, su ocurrencia representa una pieza en la cadena de información química. Diferentes biomarcadores

proveen diferentes piezas de evidencia que puede ser característica de la fuente o de los procesos ambientales al que el derrame ha sido sometido. Dado que los patrones de los compuestos azufrados difieren notablemente entre diferentes fuentes, presentan un alto contenido informativo con respecto a la identificación del origen.

En la figura 8, se muestra un ejemplo de la representación gráfica de la relación C_2/C_3 DBT (dibenzotiofeno) con respecto a C_2/C_3 fenantreno, donde se clasificaron 14 residuos de crudos desde la zona de *Prince Williams Sound*, en Alaska, después de 18 años del derrame de la *Exxon Valdez*, de acuerdo a su grado de meteorización (Michel y otros, 1999, p. 123). Se observa como los residuos de crudo oscilan entre moderado a extremadamente meteorizados. En esta misma investigación, encontraron que los benzotiofenos incrementaron en su abundancia relativa y fueron los PAC, los compuestos dominantes en etapas avanzadas y extremas de meteorización.

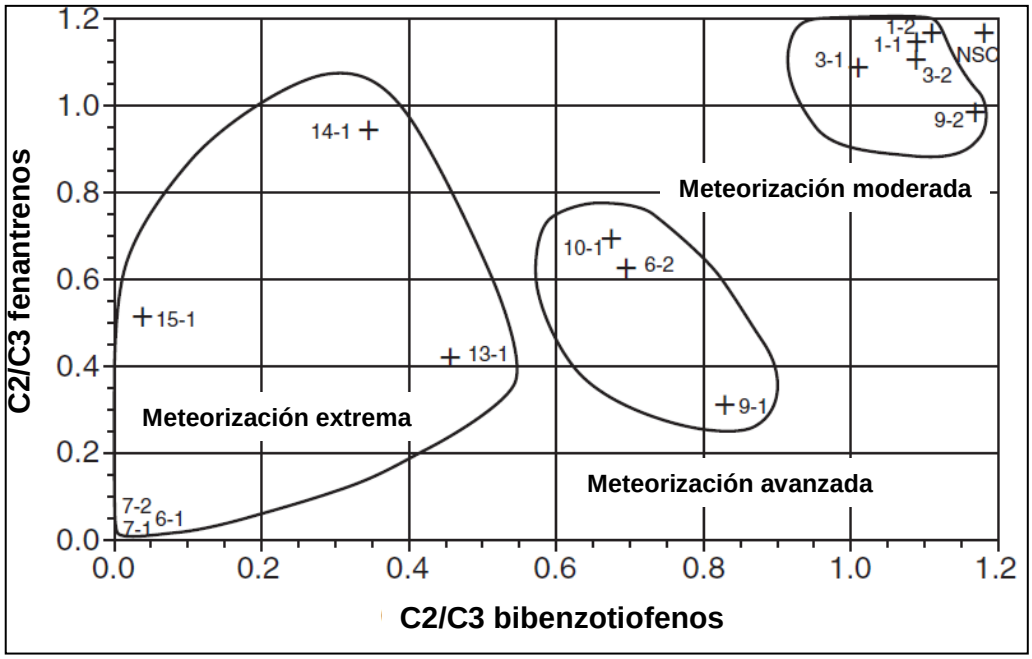

Figura 8. Gráfica de la relación C_2/C_3 dibenzotiofenos con respecto a C_2/C_3 fenantrenos de residuos de crudos desde la zona de *Prince Williams Sound*, Alaska, luego de 8 años al derrame de la *Exxon Valdez*. La muestra identificada con NSC es el crudo original (Fuente: Michel y otros, 1999, p. 123)

- Caracterización del origen del derrame petrolero a través de la cromatografía de gases en dos dimensiones (GC x GC)

Desde el comienzo del desarrollo de la técnica GC x GC, se ha utilizado en la caracterización del petróleo, debido a que las muestras de crudo contienen miles de compuestos que representan un verdadero desafío para separarlos a través de los métodos cromatográficos típicos de una dimensión. La GC x GC proporciona la separación necesaria para distinguir entre compuestos mayoritarios y minoritarios, así como también, grupos de compuestos (por ejemplo: parafinas, isoparafinas, olefinas y naftenos aromáticos).

La separación y análisis de compuestos se ha realizado en los biomarcadores del crudo, en compuestos nitrogenados y en azufrados (Blomberg, Riemersma y Chaabani, 2004). La técnica ofrece una separación de muy alta resolución con una salida de datos susceptible a la comparación cualitativa y cuantitativa entre muestras usando compuestos individuales y clases de compuestos.

Gaines, Frysinger y Nelson (1999), realizaron la primera aplicación de la técnica en la caracterización de un derrame de aproximadamente 100 galones de diesel de embarcaciones marinas en una bahía cerca de Mobile, Alabama, Estados Unidos. Se empleó para determinar similitudes y diferencias cualitativas y cuantitativas entre el derrame y las posibles fuentes de contaminación. El alto poder de resolución, separó cientos de compuestos de la compleja matriz del crudo, logrando diferenciarse compuestos individuales y grupo de compuestos.

Para el análisis de este derrame, fueron usados marcadores tradicionales como los alcanos, alquilbencenos, alquilnaftalenos y fenantrenos. Una clase de marcador no convencional fue encontrada: los alquiciclohexanos. Los resultados obtenidos al compararlos con métodos estándares de GC para establecer huellas características fueron favorables. Una muestra con evidencias de leve meteorización fue colectada en la superficie del agua aproximadamente 24 horas después del derrame. Se recogieron muestras de dos posibles fuentes (designadas como Fuente 1 y Fuente 2): Los tanques

del combustible de dos buques pesqueros sospechosos que se encontraban cerca al evento.

La figura 9, presenta una porción del cromatograma de las 3 muestras analizadas por GC x GC. La muestra del derrame se muestra en el panel A; la Fuente 1 en el panel B y la Fuente 2 en el panel C. El rango de los n-alcanos es desde tridecano (C_{13}) hasta eicosano (C_{20}). Esta región contiene características adecuadas para analizar las huellas químicas, mientras que los compuestos elucidados con peso moleculares menores, no son los más propicios para esta caracterización, debido que están modificados por los procesos de evaporación y disolución mientras el crudo derramado se encontraba en el agua.

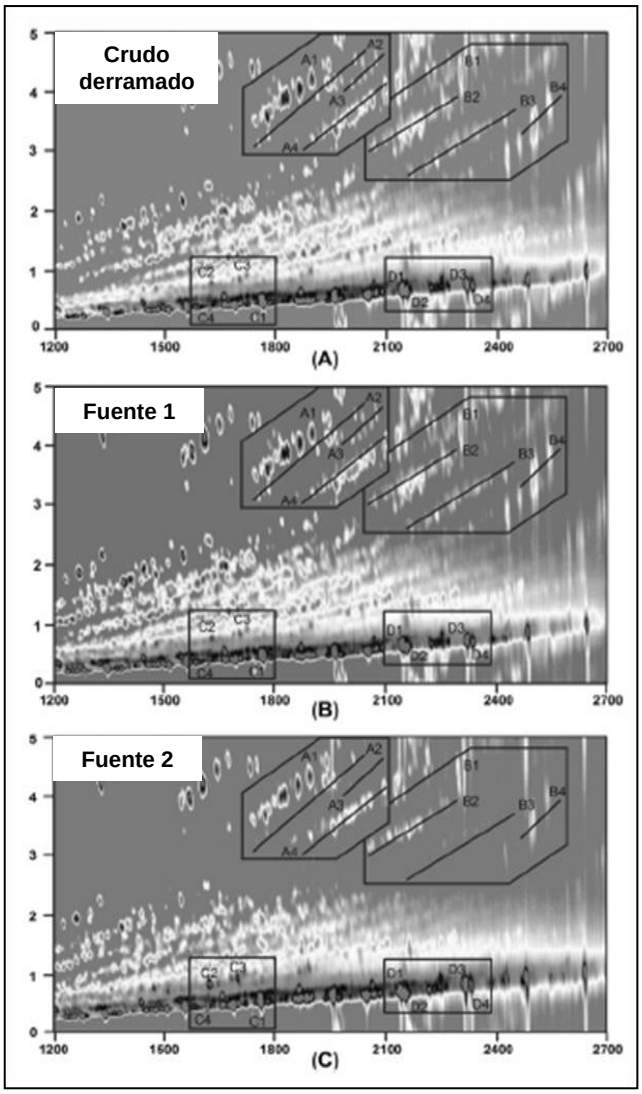

Figura 9. Porción del cromatograma de volatilidad por polaridad de las 3 muestras analizadas por GC x GC. La muestra del derrame se muestra en el panel A, la Fuente 1, en el panel B y la Fuente 2 en el panel C. Las cajas contienen familias de compuestos y compuestos individuales (Fuente: Gaines, Frysinger y Nelson (1999), p. 2210)

Cada muestra fue comparada con el derrame de manera cualitativa, por el método de comparación visual, y cuantitativamente a través de la integración de picos seleccionados y bandas de picos. Las similitudes y diferencias visuales entre los cromatogramas de la muestra del derrame y de las dos fuentes sospechosas, se

realizó mediante la comparación por ausencia o presencia de picos en un tiempo de retención particular y midiendo el tamaño relativo del pico.

Basado en los resultados cualitativos y cuantitativos, se logró establecer la Fuente 1 con la mayor coincidencia con el crudo derramado. Estos resultados se evaluaron adicionalmente con los obtenidos por la cromatografía de gases de alta resolución, obteniéndose coincidencias favorables.

En términos generales, la separación a través GC X GC ofrece resultados con mayor resolución que la cromatografía de gases convencional para el análisis de mezclas complejas la del crudo y sus productos refinados. El alto poder de resolución del GC x GC da una mejor definición de los compuestos presentes, detectando, identificando y cuantificando compuestos individuales y familia de compuestos. Actualmente, esta técnica está expandiendo su aplicación en la caracterización de las huellas características en accidentes o derrames petroleros. Sin embargo, la complejidad de su interpretación y el alto costo del instrumental analítico limitan su uso.

2.2.2. Geoquímica Orgánica del Petróleo

López (2013), define la Geoquímica Orgánica como:

> El estudio del origen, composición, distribución y destino de la materia orgánica en la Tierra, abarcando desde los organismos vivos hasta sus productos de degradación, por lo que sus áreas de estudio incluyen desde el origen de la vida hasta la materia orgánica de origen antrópico. (p. 15)

Algunas de las áreas de aplicación son: las sustancias húmicas y no húmicas en aguas, suelos y sedimentos, la materia orgánica en sedimentos antiguos y recientes, el origen y distribución de los combustibles fósiles, estudios ambientales relacionados a la contaminación por compuestos orgánicos, la interacción entre la materia orgánica con metales contaminantes y la biorremediación.

2.2.2.1. Crudo Definición

De acuerdo con Tissot y Welte (1984) el crudo “es una mezcla de hidrocarburos saturados y aromáticos junto con compuestos orgánicos poliaromáticos y heteroatómicos de estructura compleja y alta masa molecular denominados resinas y asfaltenos”. (p. 120). Los heteroátomos encontrados dentro de las resinas y los asfaltenos son nitrógeno, azufre y oxígeno.

De esta manera la composición química general de los crudos puede ser discriminada tomando en consideración las cuatro fracciones que lo constituyen y las variaciones en las proporciones relativas y tipo de compuestos específicos puede ser consecuencia del origen, evolución o alteración del crudo. El crudo presenta cuatro (4) fracciones principales, las cuales se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Composición del crudo en fracciones (Fuente: Killops y Killops, 2005)

Saturados	Son los hidrocarburos constituidos por alcanos acíclicos (n-alcanos e isoalcanos: isoprenoides), alcanos cíclicos (cicloalcanos o naftenos) y alquenos. La dependencia en la concentración de n-alcanos con respecto al origen de la materia orgánica, la etapa de madurez y los procesos de alteración en el yacimiento hacen que su concentración en crudos sea muy variable y de manera general puede encontrarse entre 15 y 20% aunque puede ser muy baja en crudos pesados (< 8%) o muy alta en crudos livianos (> 50%). La concentración de isoalcanos en crudos está alrededor del 1% y los más abundantes están en el intervalo de C_9 a C_{25}, aunque se han encontrado isoalcanos con menos de 10 átomos de carbono, siendo las configuraciones de carbonos cuaternarios muy raras. Los cicloalcanos son las estructuras más comunes en crudos, llegando a alcanzar 50% en promedio.
Aromáticos	Todos los aromáticos deben poseer al menos un anillo bencénico en su estructura y comprenden compuestos mono-, poli-, nafteno- y sulfuroaromáticos cuya fórmula general es C_nH_{2n-p}, donde p varía con el número de anillos. La abundancia de los hidrocarburos aromáticos en crudos no excede el 15%.
Resinas	Operacionalmente las resinas son definidas por Yen (2000) como “la fracción del crudo insoluble en álcalis y ácidos, pero completamente solubles en alcanos incluyendo hidrocarburos como el pentano, o de mayor número de átomos de carbono (hexano, heptano). Las resinas son definidas como compuestos que contienen grupos con características polares, los cuales algunas veces pueden contener heteroátomos como O, S y N, junto con grupos parafínicos no polares.
Asfaltenos	Acevedo (2001), define operacionalmente los asfaltenos como “la fracción del crudo insoluble en solventes alifáticos de baja masa molecular (n-C_5 a n-C_7), pero solubles en tolueno, estos constituyen entre el 0 y el 20 % de la masa total del crudo”. (p.34). Desde el punto de vista de su composición química son compuestos constituidos por moléculas condensadas del tipo aromáticos y naftenos, ricas en heteroátomos (N, S, O) y metales 42 traza (V, Ni), cuyas masas moleculares que varían desde 200 hasta 15000 g/mol. Los asfaltenos no están disueltos en el crudo pero sí dispersados o suspendidos en el fluido como coloides, y cuando son aislados como fracción estos son negros, no volátiles y tienden a craquearse antes de alcanzar su punto de ebullición.

La industria petrolera clasifica el petróleo crudo según su lugar de origen y también con base a su densidad o gravedad API (ligero, medio, pesado, extra pesado); los refinadores también lo clasifican como "crudo dulce", que significa que contiene relativamente poco azufre, o "ácido", que contiene mayores cantidades de azufre y, por

lo tanto, se necesitarán más operaciones de refinamiento para cumplir las especificaciones actuales de los productos refinados. En la tabla 5, se presentan las dos clasificaciones más usadas en la industria.

Tabla 5. Clasificaciones más usadas de los crudos. (Fuente: Lira-Galeana y Hammami, 2000)

Según la gravedad API	Crudos Convencionales: desde 52,5º hasta 25,1º API (densidad < 0,904 g/cc).
	Crudos Intermedios o medianos: desde 25,0º hasta 20,1º API (densidad 0,904 < d < 0,934 g/cc).
	Crudos Pesados: desde 20,0º hasta 10,0º API (densidad 0,934 < d < 1,000 g/cc).
	Crudos Extrapesados: menores de 10,0º API (viscosidad máxima de 10.000 cp y d > 1,000 g/cc).
	Arenas Bituminosas: viscosidad mayor de 10.000 cp.
Según su Composición	Crudos Parafínicos: presentan una concentración de hidrocarburos saturados mayor del 50%, incluyendo principalmente alcanos normales e iso-alcanos y menos de 1% de azufre.
	Crudos Nafténicos o Asfálticos: incluyen una concentración de más de 50% de hidrocarburos saturados, un porcentaje de naftenos mayor del 40%, y menos del 1% de azufre. Esta clase incluye crudos degradados, los cuales generalmente contienen menos del 20% de n-alcanos e iso-alcanos.
	Crudos Parafínicos-Nafténicos: poseen porcentajes moderados de resinas más asfaltenos (generalmente de 5-15%), además presentan una concentración de hidrocarburos saturados mayor del 50%, conteniendo tanto alcanos normales como cicloalcanos y un porcentaje de azufre menor de 1%.
	Crudos Aromáticos-Intermedios: contienen menos de 50% de hidrocarburos saturados; el contenido de aromáticos, resinas y asfaltenos sobrepasa el 50%; estos crudos presentan una concentración de n-parafinas menor del 10% y generalmente más del 1% de azufre.
	Crudos Aromáticos-Nafténicos: presentan concentraciones de hidrocarburos nafténicos mayor del 25%, menos del 50% de hidrocarburos saturados, menos de 1% de azufre y además presentan menos del 10% de n-parafinas.

2.2.2.2. Procesos de alteración del crudo

El término de alteración del crudo se refiere a los procesos secundarios que ocurren desde que éste migra hasta su entrampamiento y tiempo de residencia en el yacimiento, estos procesos permiten que el petróleo siga evolucionando o cambiando desde el punto de vista físico y químico en un yacimiento y son conocidos como procesos de alteración. A continuación, se presentan los procesos de alteración del crudo (Tabla 6), de acuerdo a Wilhelms y Larter (1994).

Tabla 6. Procesos de alteración del crudo (Fuente: Wilhelms y Larter, 1994)

Biodegradación	Es el proceso mediante el cual las bacterias metabolizan el crudo dentro del yacimiento para satisfacer sus requerimientos energéticos. Al ser controlado por organismos vivos, el proceso es completamente selectivo y el crudo es alterado de forma secuencial por la capacidad de adaptación que poseen los grupos de bacterias que les permite adaptar su metabolismo al tipo de hidrocarburos disponibles. La relevancia por parte de los investigadores en avanzar en la comprensión del proceso de biodegradación y sus efectos sobre el crudo, se debe a que, los recursos de crudo pesado y bitumen dominan el inventario petrolero mundial. Se estima que estos recursos abarcan 5 veces las reservas de petróleo convencionales restantes (Stainforth, 2009, p. 554).
Lavado por aguas	Ocurre en crudos que se encuentran en contacto con flujo de aguas insaturadas en hidrocarburos y de baja solubilidad, porque esta actúa como medio de transporte de los compuestos orgánicos más solubles, que incluyen hidrocarburos de baja masa molecular, como n-alcanos menores a n-C_6, ciclo y metilcicloalcanos y aromáticos como benceno, tolueno y xileno. Así el lavado por aguas altera la composición C_{15}^- del crudo, haciendo al crudo residual más pesado y es efectivo únicamente en el contacto agua – crudo.
Alteración térmica	*S*e lleva a cabo en yacimientos que son sometidos a condiciones de temperatura similares a las condiciones de generación del petróleo, provocando el craqueo térmico de los componentes del crudo. Como consecuencia el yacimiento se enriquecerá en fracciones más livianas junto con un residuo poliaromático e insoluble conocido como pirobitumen.
Desafaltación	*O*curre cuando gas húmedo o una segunda carga de crudo de menor gravedad API entra en contacto con el crudo en el yacimiento e induce la precipitación de asfaltenos, trayendo como consecuencia un crudo más liviano junto con un residuo pesado enriquecido en asfaltenos conocido como *tar mats*. La desafaltación constituye solo uno de los procesos formadores de *tar mats*, en donde también se incluye la alteración térmica, la reducción de presión y la precipitación de asfaltenos inducidos por adsorción sobre minerales de arcilla, mezcla de crudos y migración.

Tabla 6. Continuación	
Fraccionamiento evaporativo	Es un proceso en donde la fase gaseosa del petróleo migra verticalmente a través de fallas o fracturas y es entrampada como condensado en yacimientos más someros. En el yacimiento, el crudo puede estar sobresaturado en metano, durante la migración los hidrocarburos líquidos se separan de la fase gaseosa y abandonan el ascenso (similar al proceso de destilación) dependiendo de su polaridad, estructura y tamaño molecular. Los condensados están compuestos por altas concentraciones de aromáticos (benceno, tolueno y xileno) y la distribución de hidrocarburos típica de crudos livianos.
Precipitación de ceras	Se lleva a cabo en crudos ricos en ceras, generalmente compuestos por más del 80% de hidrocarburos nafténicos y parafinas, que migran a yacimientos más someros y alcanzan el punto nieve, que es la temperatura en la cual los hidrocarburos sólidos son separados de la solución por disminución de temperatura, produciendo la precipitación de las ceras. Al extraer este tipo de crudos del yacimiento, debe considerarse el calentar el crudo para evitar la cristalización de ceras en las tuberías de producción, aunque generalmente los crudos son descerados cercanos a la tubería o mezclados con crudos aromáticos para prevenir la cristalización.
Segregación gravitacional	Es el proceso por el cual el campo gravitacional de La Tierra establece gradientes de concentración dentro de una columna estática de petróleo. Este proceso fue descrito por Tissot y Welte (1984) indicando que “se lleva a cabo en yacimientos de gran extensión vertical pero con pequeñas variaciones de temperatura del tope a la base”. (p.231). Bajo estas circunstancias los crudos pueden hacerse más pesados hacia la base del yacimiento y más enriquecidos en gases hacia el tope, así la densidad total del crudo en el tope es más baja y la relación gas crudo es más alta con relación a la base del yacimiento. Sin embargo, la alta concentración de gases en el tope puede producir la precipitación de asfaltenos, los cuales estarían en relación inversa a la gravedad.

2.2.2.3. Caracterización del crudo a través de la Geoquímica Orgánica

La correlación de crudo-crudo y de crudo-roca fuente son de las aplicaciones más utilizadas en la geoquímica del petróleo. La confirmación de que un crudo se ha acumulado en una cuenca sedimentaria, es la pieza más crítica del reconocimiento exploratorio; la segunda en importancia es la determinación de la fuente de ese crudo. Por esta razón, un amplio grupo de métodos de análisis se utiliza para recoger datos primarios de la materia orgánica en los crudos y en sus posibles rocas madres, y varios

componentes de estos datos se utilizan para correlacionar causalmente los crudos con sus fuentes potenciales.

Todos los métodos de análisis utilizados por la Geoquímica para caracterizar los crudos y la materia orgánica en las rocas fuentes, aportan la confiabilidad y precisión de los datos analíticos, que combinados con una comprensión de la historia geológica, permite establecer con éxito el origen y la migración de un crudo. A continuación se presentan los dos análisis más usados para la caracterización geoquímica del crudo:

- *Fracción C_{15}^{+}.* Alberdi, Toro y Maguregui (1995), definen a la fracción C_{15}^{+} como

  > La fracción que comprende el conjunto de parafinas e isoprenoides entre la parafina lineal C_{14} y la parafina lineal C_{32}, fue la primera técnica geoquímica molecular que se utilizó en la década de los setenta para elucidar el tipo de materia orgánica que originó al crudo y los procesos de biodegradación que cambian las propiedades del crudo en los yacimientos. (p.24)

La fracción de hidrocarburos saturados de bitúmenes y crudo son analizados a través de la GC-FID (Figura 10) o la GC-MS (con los picos patrón a m/z 99, 113). Se identifican los n-alcanos e isoprenoides acíclicos y se obtiene su concentración en la fracción de hidrocarburos saturados, a través del uso de patrones de concentración conocida. Alternativamente, se trabaja con las áreas de las señales, las cuales son proporcionales a las concentraciones de los compuestos.

El patrón de distribución de los n-alcanos, permite inferir el tipo de materia orgánica de origen; esto basado en la abundancia relativa de los n-alcanos de baja masa molecular ($<$n-C_{25}) respecto a los de alta masa molecular ($>$n-C_{25}). Los patrones de distribución se utilizan de la siguiente manera: distribución unimodal: máximo en los n-alcanos $<$n-C_{25} para materia orgánica marina o lacustre, máximo en n-alcanos $>$n-C_{25} para materia orgánica terrestre; y distribución bimodal: máximos en los n-alcanos $<$n-C_{25} y $>$n-C_{25} para materia orgánica mixta (Tissot y Welte, 1984, p.501).

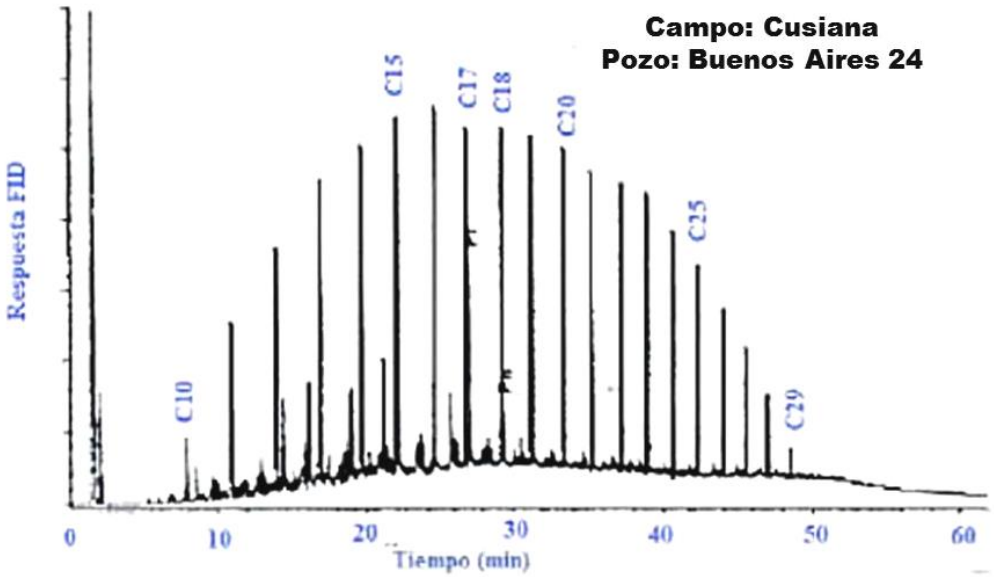

Figura 10. Distribución de n-alcanos e isoprenoides (pristano Pr y fitano Ph), obtenida por cromatografía de gases para la fracción de hidrocarburos saturados de un crudo de los llanos colombianos (Fuente: Cortes y otros, 2010, p. 210)

La abundancia relativa de los isoprenoides pristano y fitano se utiliza como indicadora de las condiciones redox del ambiente de sedimentación de la roca fuente, su análisis se utiliza para bitúmenes o crudos. Basado en lo anterior, la abundancia relativa de pristano y fitano, medida a través de la relación pristano/fitano (P/F), se usa como indicadora de condiciones redox (Didyk y otros, 1978, p.223). Se considera que P/F < 1 es característico de rocas fuente sedimentadas en condiciones anóxicas, P/F > 1 de rocas fuentes sedimentadas en condiciones subóxicas a disóxicas, P/F > 3 de materia orgánica de origen terrestre, sedimentadas en condiciones óxicas y P/F < 0,8 de materia orgánica sedimentada en condiciones anóxicas en ambientes carbonáticos o hipersalinos (Peters, Walters y Moldowan, 2005, p. 357).

Otro parámetro utilizado en la fracción C_{15}^{+}, es el índice preferencial de carbono (CPI), y se basa en los cambios progresivos en la distribución de los n-alcanos de cadena larga durante el proceso de maduración del crudo.

La relación de carbonos impares a carbonos pares es la siguiente:

$$CPI = ½ * ((X/Y) + (X/Z))$$

Donde:

X= suma de los n-alcanos impares de C_{25} a C_{31}

Y= suma de los n-alcanos pares de C_{24} a C_{30}

Z=suma de los n-alcanos pares de C_{26} a C_{32}

El CPI tiende a la unidad a medida que se incrementa el grado de madurez. En el caso de sedimentos inmaduros, un CPI elevado refleja una contribución de materia orgánica terrestre, derivada de plantas superiores.

- *Biomarcadores o marcadores geoquímicos.* Peters, Walters y Moldowan (2005), definen a los biomarcadores como:

  Las moléculas orgánicas complejas correspondientes a productos naturales específicos constituidos por carbono, hidrogeno, nitrógeno y otros elementos. Están presentes en extractos orgánicos obtenidos de sedimentos, rocas y crudos, y tienen una estructura similar al precursor biológico respectivo. (p.17)

La preservación de los biomarcadores depende de la estabilidad de la estructura del precursor biológico ante el ataque bacterial. Por lo tanto, la estructura orgánica de un biomarcador es lo suficientemente estable como para permanecer con pocos cambios durante las etapas de maduración de la materia orgánica, es decir, se mantiene a través de las transformaciones en el tiempo geológico que dan origen a la formación de los combustibles fósiles.

Dependiendo de la estructura química, hay dos grandes grupos de biomarcadores: los alifáticos y los aromáticos; dentro de cada grupo hay posteriores clasificaciones según la secuencia estructural. Adicionalmente, existe un tercer grupo, correspondiente a compuestos aromáticos, para cuyas estructuras no hay suficiente evidencia de su origen, a partir de un producto natural precursor.

Los biomarcadores se identifican mediante el análisis de cromatografía de gases acoplado a masas. Para ello, se obtienen las distribuciones denominadas fragmentogramas o cromatogramas de masas, con relaciones masa/carga (m/z) especificas. Adicionalmente, los n-alcanos e isoprenoides acíclicos se pueden identificar mediante la GC-FID.

Los marcadores geoquímicos tienen muchas aplicaciones en la Geoquímica del Petróleo. Son básicamente utilizados en la determinación de parámetros que ilustren el origen, la fuente, la edad, asociados al petróleo.

Las interpretaciones obtenidas de su estudio se aplican en la exploración y producción de hidrocarburos. En exploración permiten realizar correlaciones crudo-crudo y crudo-roca fuente. A partir del análisis en crudos se pueden utilizar para inferir las características de la roca fuente de origen, y determinar el nivel de biodegradación de crudos.

Sin embargo, de acuerdo a lo resumido por López (2013) este parámetro geoquímico tiene varios aspectos a ser considerados en su utilización:

1. La madurez puede variar dependiendo de la litología de la roca fuente, por lo que se debe utilizar para la correlación en muestras de madurez similares.
2. La formación de productos durante la generación de crudo, podría variar por la concurrencia de múltiples factores, que deben analizarse con cuidado en la interpretación.
3. La concentración de biomarcadores disminuye con la madurez, lo que inhibe su utilidad en bitúmenes y crudos de rocas fuente sobremaduras. (p. 31)

2.2.3. Isótopos

2.2.3.1. Definición

Hoefs (2009), define a los isotopos como “los átomos cuyo núcleos tienen el mismo número de protones pero un diferente número de neutrones”. (p.1)

2.2.3.2. Notación de abundancia isotópica

Hayes (2002), explica que la abundancia isotópica absoluta es comúnmente definida en términos de porcentaje de átomos (p.47). Por ejemplo:

$$\text{Porcentaje de } {}^{13}C = \left[\frac{{}^{13}C}{({}^{12}C + {}^{13}C)} \right] * 100$$

Las relaciones isotópicas también son medidas de la abundancia isotópica absoluta, son usualmente presentados de manera que el isótopo abundante aparezca en el denominador:

$$\text{”Relación isotópica de carbono”} = \frac{{}^{13}C}{{}^{12}C} = {}^{13}R$$

Notación delta (δ). Hoefs (2009), plantea que, la mayoría de las mediciones isotópicas son mediciones diferenciales, y que las diferencias isotópicas interesantes en muestras naturales normalmente se producen después de la tercera cifra significativa en la relación isotópica, por lo que se ha establecido una expresión convencional de abundancias isotópicas utilizando una notación diferencial.

$$\delta^{A}X_{std} = 1000 * \left[\frac{({}^{A}R_{sample} - {}^{A}R_{std})}{({}^{A}R_{std})} \right]$$

Esta expresión define una relación explícita entre la abundancia del isótopo A del elemento X en una muestra dada y su abundancia en un estándar especifico (definido por “std”) (p.9).

2.2.3.3. Tipos de isótopos

Hoefs (2009), presenta dos tipos de isótopos: naturales y artificiales (p.8):

a.) *Isótopos estables.* Son los isótopos donde el núcleo no se desintegra espontáneamente permitiendo conservar sus propiedades Fisicoquímica, a través del tiempo geológico. En la tabla 7, se presentan la abundancia de los isótopos naturales más comunes en la naturaleza.

Tabla 7. Abundancia de los isótopos naturales más comunes en la naturaleza (Fuente: Royo y Gómez, 1974, p. 361)

Átomo	**H**		**C**		**N**		**O**		
Masa	1	2	12	13	14	15	16	17	18
%	99,98	0,0156	98,89	1,11	99,64	0,36	99,763	0,0375	0,1995

b.) *Isótopos radiactivos:* Este tipo de isótopos se caracteriza porque el núcleo del átomo se desintegra espontáneamente, por el incremento de las repulsiones de Coulomb, experimentando cambio en su estructura nuclear. Durante estas transformaciones el núcleo desprende energía en forma de radiaciones, que se conoce con el nombre de radiactividad. Este proceso de transformación puede ser de origen natural o bien inducido artificialmente.

2.2.3.4. Relaciones isotópicas en compuestos específicos de hidrocarburos (CSIA)

La mayoría de los análisis de isótopos estables de carbono se realizan mediante la combustión en línea con un analizador elemental acoplado y un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (combustión/IRMS). La GC-IRMS, ha sido una técnica con los mayores avances en el campo de la Geoquímica Orgánica en las últimas dos décadas (Hoefs, 2009, p. 149).

Este enfoque permite el uso de muestras de tamaño mucho más pequeño que en los métodos del pasado. Además, un cromatógrafo de gases puede ser acoplado al sistema de combustión, permitiendo que las relaciones de isótopos de carbono se pueda determinar en compuestos individuales orgánicos (GC/combustión/IRMS), esto se conoce como análisis isotópico de compuestos específicos (CSIA).

Hoefs (2009), establece que las primeras investigaciones en el área isotópica se basaron principalmente en el análisis de isótopos de carbono, observándose diferencias en los valores de $\delta^{13}C$ en las fracciones saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos. De tal manera, que la Geoquímica Isotópica fue reconocida por los geólogos como una herramienta útil en la exploración de petróleo. Sin embargo el progreso de esta área se veía obstaculizado por: (1) el fondo inadecuada en la determinación de los isótopos de compuestos orgánicos complejos, (2) una base de datos limitada en la composición isotópica de moléculas biológicas que son precursoras potenciales de componentes del petróleo y (3) el reducido conocimiento del comportamiento de los isótopos en los procesos de diagénesis y catagénesis. (p.123)

La determinación de CSIA n-alcanos se logró utilizar para la identificación de diferentes fuentes de crudos. Guthrie y otros (1996) utilizaron CSIA para caracterizar una serie de lutitas (inmaduras) ricas en material orgánico de diferentes cuencas en Brasil. Las composiciones isotópicas de carbono de los n-alcanos (por ejemplo, n-heptadecano), pristano, fitano, 28,30-bisnorhopano, hopano y gammacerano, permitieron distinguir

tanto las muestras de roca fuente como los crudos generados a partir de éstas. Se logró observar, que estos compuestos son consistentemente más empobrecido en ^{13}C entre las lutitas lacustres en comparación con lutitas marinos. La relación positiva de hopano/ciclopentano, las composiciones empobrecidas de ^{13}C para estos compuestos soporta la teoría del aumento de la abundancia de las bacterias metanogénicas a las lutitas lacustres. (p. 445)

- Instrumental analítico empleado.

Los avances en la instrumentación han permitido ampliar la aplicación de las relaciones isotópicas, para evaluar la presencia de alcanos policíclicos inusuales en los extractos de rocas fuentes y los crudos donde los hopanos y esteranos estaban ausentes o presentes en muestras de mínima abundancia.

La determinación isotópica (CSIA) combinada con el estudio de la estructura molecular de los biomarcadores, es la práctica más común y eficiente en la Geoquímica Orgánica actual.

Peters, Walters y Moldowan (2005), describieron la técnica analítica de la siguiente manera

> Los análisis de composición isotópica de carbono son completados usando sistema de combustión en línea acoplado con un analizador elemental y un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (combustión/IRMS). Esta técnica permite el uso de muy poca cantidad de muestra. Adicionalmente, un cromatógrafo de gases es acoplado al sistema de combustión, permitiendo a las relaciones isotópicas de carbono ser determinadas en compuestos orgánicos individuales (CG/combustión/IRMS o también llamado análisis isotópico de compuestos específicos o CSIA) (Figura 11). (p.138)

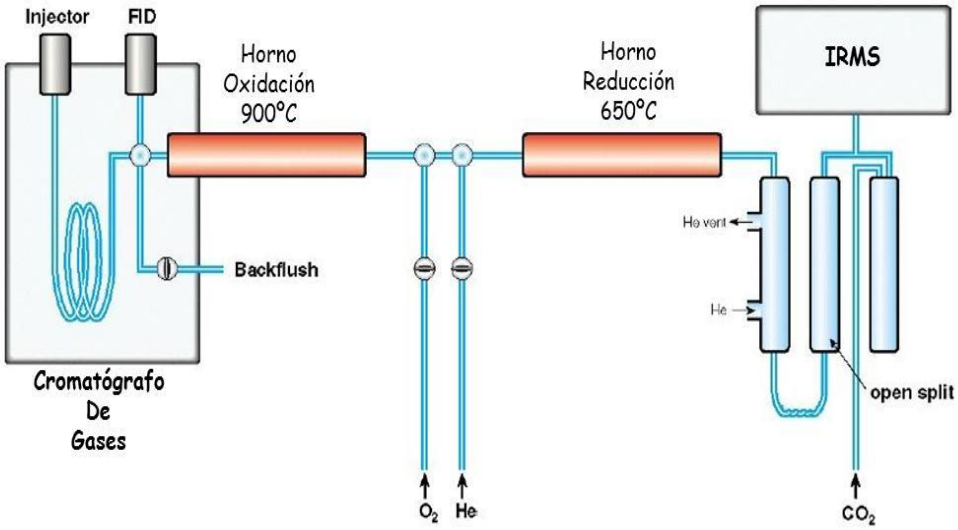

Figura 11. Diagrama del GC-IRMS y sus principales componentes (Fuente: Rivas, 2013)

2.2.3.5 .Factores que afectan las relaciones isotópicas durante la generación del crudo (biodegradación, madurez y origen de la roca fuente)

1. <u>Efectos del origen o la naturaleza de la materia orgánica</u>. Los alcanos de cadenas lineales (n-alcanos o parafinas) son los biomarcadores más comunes que se encuentran en la materia orgánica y se conocen por ser biosintetizados por una amplia variedad de plantas, tanto de origen marino como terrestre. En las plantas superiores de origen terrígeno, los n-alcanos se derivan de ceras epicuticulares y son en general cadenas de longitudes largas (C_{25}-C_{35}) (Borges del Castillo, 1967, p. 395). Los de origen algal o fitoplancton, están compuestos de n-alcanos de cadenas de longitudes cortas (C_{14}-C_{24}).

En la Geoquímica Orgánica convencional, las diferencias en la longitud de las cadenas, hizo de la distribución de n-alcanos, una herramienta eficaz para evaluar la fuente u

origen de la materia orgánica. Sin embargo, la herramienta se hace de difícil interpretación cuando la roca fuente ha sufrido cambios propios del proceso evolutivo de la materia orgánica (madurez, biodegradación, mezclas de fuentes, entre otros).

Bjorøy y Hall (1991), realizaron un estudio comparativo de las relaciones isotópicas de los componentes individuales de crudos y bitúmenes de rocas fuente de diferentes orígenes, analizándose crudos de origen marino *sensu estricto*, marino con aportes terrígeno, terrígeno *sensu estricto* y lacustre, lo que les permitió visualizar un amplio espectro del patrón de distribución característico de acuerdo al origen. Lograron concluir, que las composiciones isotópicas $^{13}C/^{12}C$ de los componentes individuales dentro de un crudo representan una firma única de su origen, sin ser afectado este comportamiento por la madurez. (p. 14) Representaron gráficamente, las proporciones de isótopos de n-alcanos en función del número de átomos de carbono en las moléculas (Figura 12). Evidenciándose, la existencia de un patrón de distribución de la composición isotópica de compuestos específicos de n-alcanos presentes en el crudo, bien definido y dependiente del tipo o de la naturaleza de la materia orgánica.

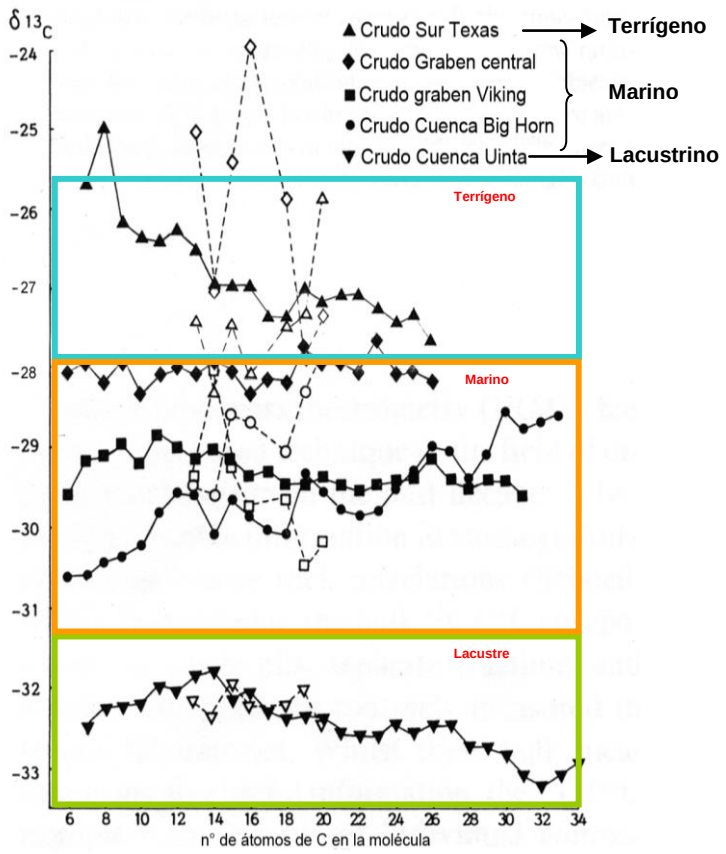

Figura 12. Comparación de las relaciones isotópicas de los n-alcanos (símbolos cerrados: n-alcanos y símbolos abiertos: isoprenoides) (Fuente: Bjorøy y Hall, 1991, p .16)

En general, se observó que los n-alcanos del crudo de origen terrígeno, es el más pesado isotópicamente, mientras que el de origen lacustrino es el más ligero de las cinco muestras. Los tres crudos de origen marino tienen relaciones isotópicas intermedias entre el terrígeno y lacustre, además que en los de origen marino a medida que aumenta el aporte terrígeno se vuelve más pesado isotópicamente.

Aunque, el perfil isotópico del crudo de origen lacustrino (crudo Cuenca Uinta), debería encontrarse entre los de origen terrígeno y marino, en este caso, el que sea el más ligero de las 5 muestras, se explica porque proviene de una roca fuente diferente a los otros crudos. Sin embargo, la forma de la curva, tipo “plana” u homogénea, si es la característica para el tipo de materia orgánica lacustrina.

2. Efectos de la madurez. Para emplear las relaciones isotópicas de carbono en estudios de correlación de crudo-crudo y crudo-roca fuente se hace necesario identificar los efectos de la madurez. Por tal motivo, además de las variaciones y el patrón de distribución en la composición isotópica de los n-alcanos de acuerdo al tipo de materia orgánica de la roca fuente, Clayton y Bjorøy (1994), lograron identificar como el incremento de la madurez sólo afecta en menor grado la huella isotópica de los n-alcanos de una roca fuente. De esta forma la relación isotópica de una muestra inmadura o sobre madura, depende directamente del tipo de organismo precursor de la materia orgánica, y conservará la misma tendencia del patrón de distribución.

Clayton y Bjorøy (1994), estudiaron el efecto de la madurez en la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ de los compuestos individuales en crudos del mar del Norte. Evaluaron una serie de crudos del mismo origen pero con diferentes niveles de madurez, recopilando datos de las relaciones isotópicas de los compuestos individuales de estos crudos. Estas muestras fueron escogidas haciendo revisión de los parámetros geoquímicos convencionales que se presentan en la tabla 8 (% SARA, índice preferencial de carbono, predominancia par e impar, relación pristano/fitano, %S, índice de metilfenantreno). (p. 745)

Los resultados reflejaron que los crudos más maduros tenían los valores de $\delta^{13}C$ menos negativos o más enriquecido en el ^{13}C (Figura 13). Se observa la representación gráfica de la relación isotópica de carbono para los compuestos individuales n-alcanos en función del número de carbono. En general, las relaciones isotópicas de carbono relativo al crudo total, observaron que los compuestos individuales se hacen isotópicamente más pesados con el aumento de la madurez térmica.

Tabla 8. Composición química y datos de madurez molecular de las muestras analizadas (Fuente: Clayton y Bjorøy, 1994)

Parámetros determinados	Crudo Buchan	Crudo Forties	Crudo Argyll	Crudo Bruce
% hidrocarburos saturados	54,9	55,8	57,9	61,1
% hidrocarburos aromáticos	9,1	9,4	10,3	7,4
%NSO	28,2	30,0	26,3	29,1
% Asfaltenos	7,8	4,8	5,5	2,4
Pristano/Fitano	0,99	1,43	1,33	1,84
CPI (índice preferencial de carbono)	1,07	1,11	1,03	1,18
MPI (índice de metilfenantreno)	0,25	0,80	0,83	0,86

En resumen, se observan dos tendencias principales: un aumento en el $\delta^{13}C$ con el aumento del peso molecular; y un incremento en el $\delta^{13}C$ de cada componente con el aumento de la madurez, con la excepción de variaciones menores en el intervalo de C_{25}-C_{30}, que se puede asociar a interferencias adicionales a partir de la coelución con otros compuestos.

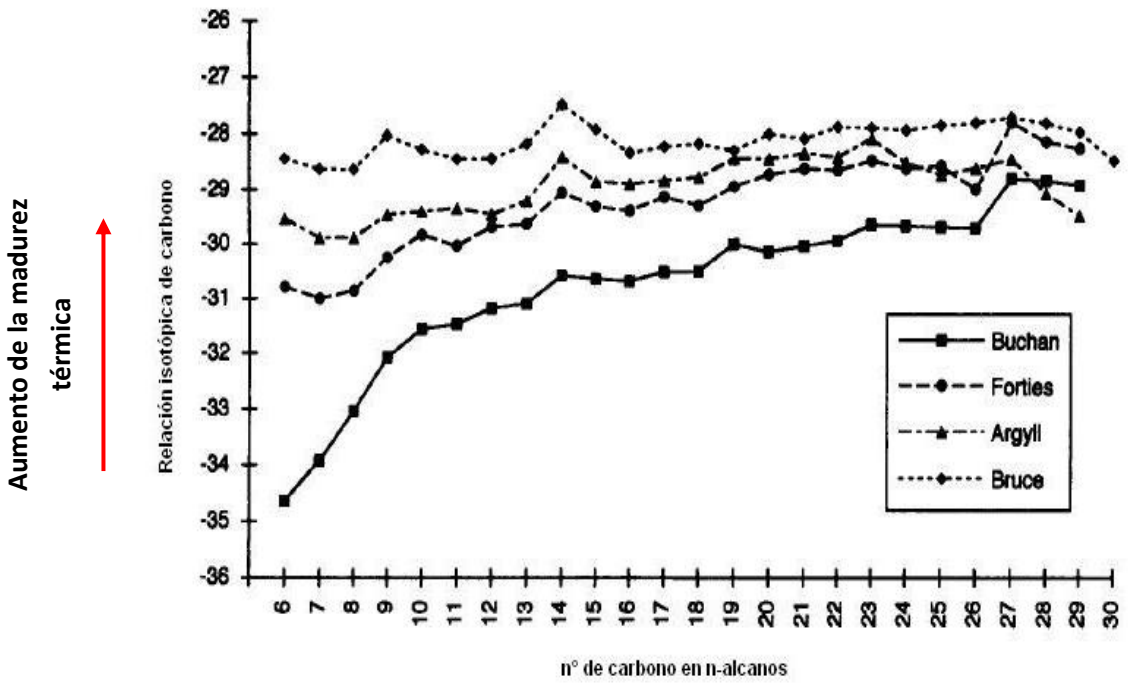

Figura 13. Relación isotópica de n-alcanos medidos en crudos totales (Fuente: Clayton y Bjorøy, 1994)

3. <u>Efectos de la biodegradación.</u> La relevancia por parte de los investigadores en avanzar en la comprensión del proceso de biodegradación y sus efectos sobre el crudo, se debe a que, los recursos de crudo pesado y bitumen dominan el inventario petrolero mundial. Se estima que estos recursos abarcan 5 veces las reservas de petróleo convencionales restantes (Stainforth, 2009, p. 567). El entendimiento de los diferentes mecanismos de alteración biológica que causan los mayores cambios en las propiedades de los fluidos en los reservorios es fundamental para la optimización de recuperación de crudo.

La determinación de las composiciones isotópicas de carbono en el crudo a nivel molecular se ha convertido de manera vertiginosa en una poderosa herramienta para definición precisa de sistemas petroleros a través de un mejoramiento en las correlaciones crudo-crudo y crudo-roca fuente.

Sun (2005), evaluaron 7 crudos de la cuenca de Liahoe, al noreste de China, con diferentes niveles de biodegradación, para determinar la magnitud y dirección de la tendencia isotópica de carbono en n-alcanos individuales durante la degradación microbiana (Figura 14). Los resultados obtenidos mostraron que la biodegradación tiene un efecto reducido sobre la composición isotópica de carbono en el crudo total. Sin embargo, una pérdida simultánea de n-alcanos permite un empobrecimiento de ^{13}C en la fracción saturada residual total. Las composiciones isotópicas de carbono de los compuestos saturados, aromáticos y materia orgánica macromolecular (resinas y asfaltenos) siguen una tendencia hacia en enriquecimiento de ^{13}C en el residuo.

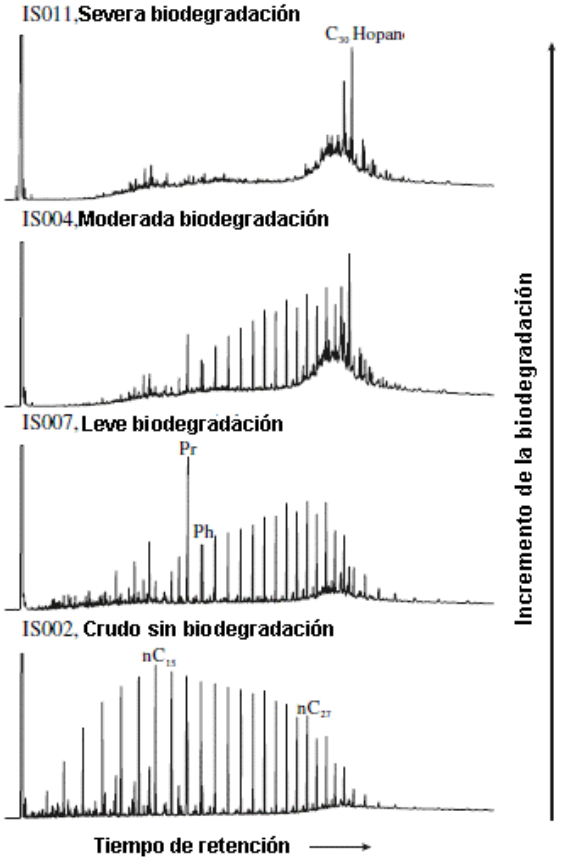

Figura 14. Cromatogramas representativos de los hidrocarburos saturados en función de la biodegradación (Fuente: Sun, 2005).

La tendencia de los valores isotópicos de $\delta^{13}C$ de los n-alcanos individuales de la secuencia progresiva de biodegradación estudiada por Sun (2005), se muestran en la figura 15. Se puede observar que los n-alcanos de mayor peso molecular ($\geq C_{19}$) permanecen constante, hasta en las muestras severamente degradadas. Por otro lado, se aprecia un incremento sistemático en los valores de $\delta^{13}C$ en los n-alcanos de bajo peso molecular.

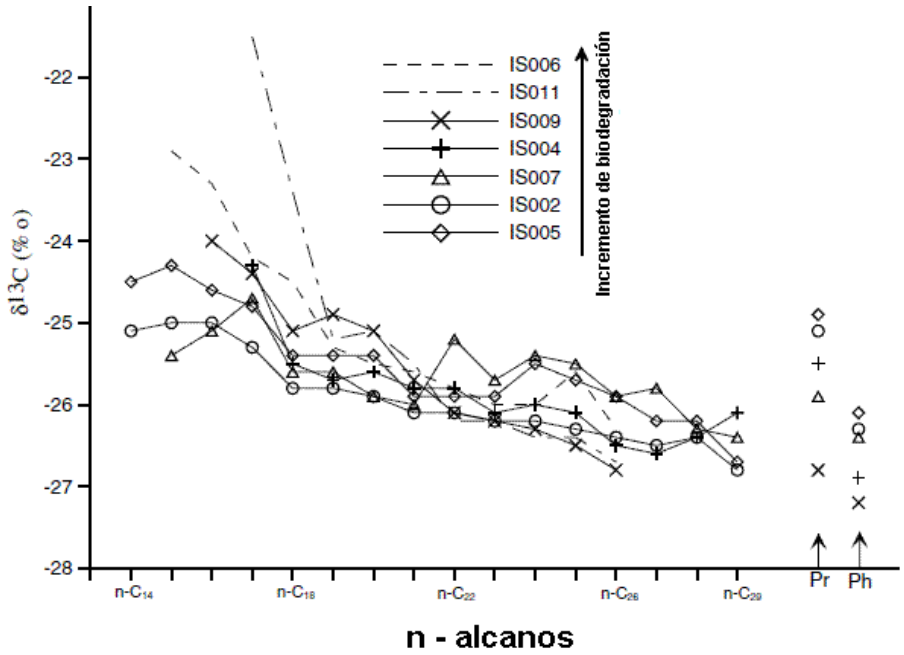

Figura 15. Perfiles isotópicos de carbono de una secuencia natural con progresiva biodegradación (Fuente: Sun, 2005)

La muestra con leve biodegradación (IS007), con un agotamiento parcial de los n-alcanos de bajo peso molecular, muestran valores bastante cercanos a los observados en las muestras no alteradas (IS002 e IS005). Con un mayor agotamiento en los n-alcanos de bajo peso molecular correspondiente a la biodegradación moderada (muestras IS00 4 e IS009), se presenta un pequeño fraccionamiento isotópico de carbono (~0,5‰ hacia valores menos negativos de $\delta^{13}C$). Para muestras severamente degradadas (IS006 e IS011), el casi total agotamiento en n-alcanos de bajo molecular

está acompañado por un significativo fraccionamiento isotópico de carbono (mayor a 4‰) hacia valores menos negativos de $\delta^{13}C$ comparados con crudos no biodegradados.

Los valores isotópicos de carbono en los n-alcanos individuales demuestran que siguen diferentes tendencias durante la biodegradación. No ocurrió un fraccionamiento isotópico significativo para los n-alcanos durante una biodegradación leve a moderada. No obstante, se aprecia un incremento general en los valores de $\delta^{13}C$ de n-alcanos de bajo peso molecular (C_{15}-C_{18}), durante una biodegradación más severa. En contraste, no se produce fraccionamiento isotópico para n-alcanos de más altos pesos moleculares ($\geq C_{19}$). El carácter conservativo de las concentraciones de ^{13}C para n-alcanos de alto peso molecular durante el proceso de biodegradación indica que estos compuestos son trazadores efectivos para la identificación de la fuente de crudos severamente biodegradados.

2.2.3.6. Aplicaciones de los compuestos específicos en los n-alcanos (CSIA n-alcanos) en el área de exploración: Correlación entre crudo–crudo y crudo–roca fuente

La correlación de un crudo con su roca fuente es una de las aplicaciones más comunes dentro de la geoquímica del petróleo, la confirmación de que el crudo ciertamente se produjo en una cuenca en exploración es quizás el punto más crítico dentro del conocimiento exploratorio, seguido solo en importancia por la determinación de la roca fuente que lo generó (Curiale, 2008, p. 1155).

Una correlación del crudo estudiado con su probable roca fuente debe cumplir con tres requerimientos claves, los cuales son: 1º) La relación debe ser causal, esto significa que el crudo generado debe ser por lo menos producido a partir de una roca fuente específica. 2º) Los datos químicos (composición elemental, molecular e isotópica) derivados de la roca fuente y del crudo a correlacionar, deben ser del mismo tipo para que puedan ser comparables. 3º) La información geológica debe soportar las

interpretaciones geoquímicas que deriven la correlación, para ello debe existir una clara evidencia geológica que respalde la roca fuente propuesta la cual generó el crudo que se correlaciona en el estudio.

Cortes y otros (2010), lograron diferenciar entre rocas fuentes Cretácicas (enriquecidas en $\delta^{13}C$ que refleja el incremento de material orgánico tipo terrígeno durante este período) de aquellas de edad Cretácico-Terciario en la cuenca de los Llanos, Colombia (p. 199). El patrón de distribución isotópica de las muestras cretácica/terciaria sugieren una significativa contribución algal/bacterial (origen marino) (Figura 16).

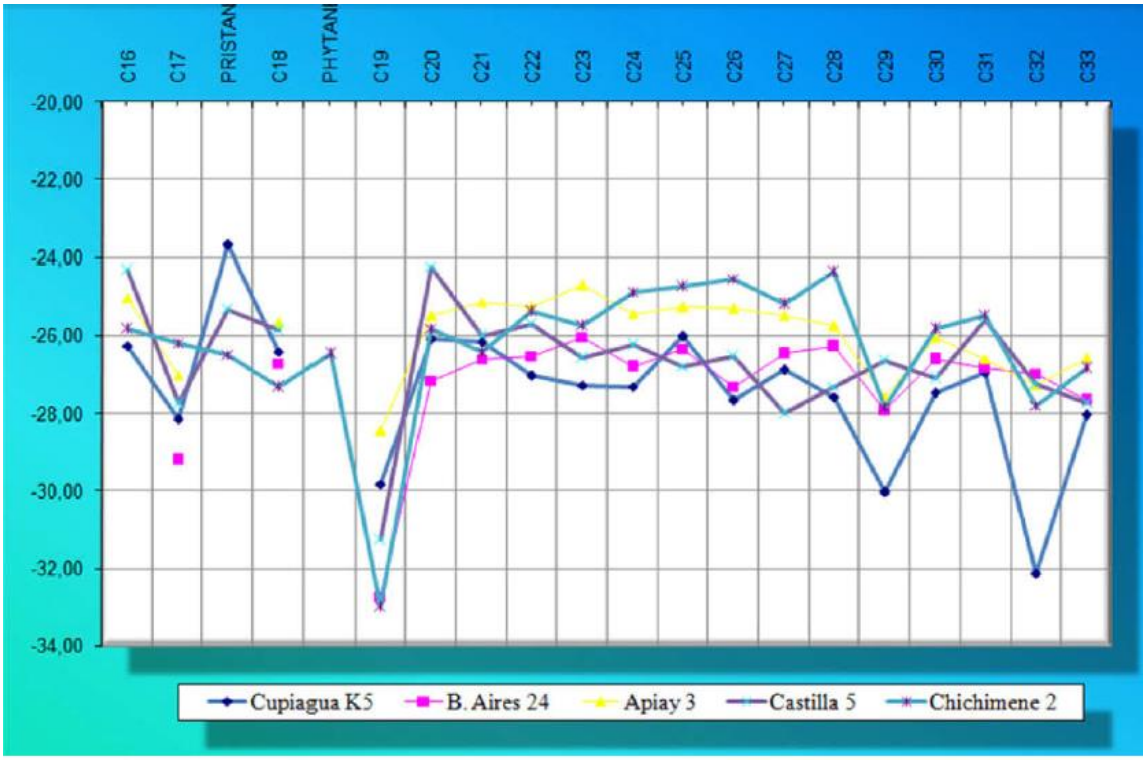

Figura 16. Perfiles isotópicas de n-alcanos de muestras seleccionadas de los Llanos colombianos (Fuente: Cortes y otros, 2010)

La mayoría de las áreas sometidas a contaminación, pueden estarlo con un único contaminante, pero por lo complejo de los procesos que ocurren en el ambiente y a lo que es sometido dicho contaminante, las técnicas analíticas de GC y GC-MS, arrojan resultados prácticamente inútiles para correlacionar o discriminar entre potenciales fuentes. Sin embargo, las variaciones en la composición isotópica pueden proporcionar un parámetro adicional para diferenciar las fuentes. La utilización de 2 ó 3 valores isotópicos (por ejemplo: C, H y Cl) ofrecen una herramienta discriminatoria más poderosa (Hostettler *et al.*, 2004). En el caso de contaminantes semi-volátiles, las huellas isotópicas de los compuestos individuales en la muestra provee otra herramienta para correlacionar en conjunción con los patrones de distribución de las técnicas GC y GC-MS (Philp y otros, 2002).

El estudio de los contaminantes orgánicos en el ambiente ha permanecido en ascenso desde hace 40 años. A principio de la década de los años 70 del siglo XX, la disponibilidad comercial de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) y la evolución de los biomarcadores en la industria petrolera, permitió la expansión del uso de estas técnicas unos pocos años después en los problemas ambientales relacionados en los derrames petroleros (Philp y otros, 2002).

Los primeros esfuerzos estaban limitados a la obtención de las huellas características de los productos derramados y su posible fuente, con la incertidumbre asociada a las técnicas analíticas en pleno desarrollo. Pero en la actualidad, estos estudios se han elevado a un nivel mucho mayor, como por ejemplo, en el caso de la gasolina, la naturaleza del craqueo catalítico usado en la refinería pueda ser determinado a través de las relaciones de los compuestos individuales en la gasolina (Murphy y Morrison, 2002). Además, la datación de productos vertidos o derramados es otra aplicación que se ha venido ampliando. La determinación de cuándo ocurrió un derrame es claramente importante, ya que, si se puede demostrar que éste sucedió en un tiempo determinado, se puede establecer las responsabilidades del evento.

Las relaciones isotópicas son una herramienta poderosa en muestras donde la meteorización ha alterado la composición molecular del crudo vertido. La evaporación

remueve los compuestos más volátiles a una tasa que depende de las condiciones del derrame y la composición inicial del crudo derramado. Por lo tanto, una superficie donde el derrame puede extenderse rápidamente, como por ejemplo, un tanquero de crudo al mar, puede resultar en una pérdida rápida de los hidrocarburos livianos en el crudo. Para un crudo liviano, el cual contiene un gran porcentaje de hidrocarburos volátiles, esto puede producir un cambio dramático en su composición molecular. En cambio, para crudos pesados o aceites lubricantes, los cuales contienen menor proporción de hidrocarburos volátiles, la evaporación puede traer como resultado cambios menores en la composición.

De manera que, en términos generales, el análisis de los compuestos específicos (CSIA n-alcanos), tiene la capacidad de aumentar el poder de resolución y disminuir la incertidumbre en la caracterización y correlación de crudos y su fuente.

2.3. Fundamentos Legales

En Venezuela, el marco legal relacionado con los derrames asociados a operaciones petroleras se fundamenta en la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, en la legislación y convenios internacionales y en las diferentes leyes, decretos, reglamentos y resoluciones publicados en Gaceta Oficial de los entes del gobierno nacional.

A continuación, se presenta en la tabla 9, las regulaciones ambientales asociadas a los derrames petroleros.

Tabla 9. Legislación ambiental aplicable a la investigación (Fuente: Elaboración propia, 2016)

	G.O. NÚMERO	DECRETO	FECHA
AMBIENTE GENERAL			
Constitución de la República Bolivariana de Venezuela.	36.860		30/12/1999
La Constitución es precisa en materia de derrames en el artículo 15 sobre el territorio y demás espacios geográficos. En los artículos 127 y 129 sobre los derechos ambientales. Finalmente, en el 299 sobre el régimen socio económico y la función del Estado en la economía y el equilibrio con el ambiente.			
Ley Orgánica del Ambiente.	5.833		22/12/2006
La ley puntualiza sobre derrames en los artículos 10 y 12 sobre la calidad ambiental. Los artículos 46 y 48 sobre recursos naturales y diversidad biológica. El artículo 57 precisa sobre la conservación de la calidad del agua. Y en los artículos 96 y 97 sobre el establecimiento de la corresponsabilidad en la gestión del ambiente.			
Ley Penal del ambiente.	4.358		02/05/2012
Haciendo especial atención a los artículos: 79 sobre la alteración de las cadenas tróficas, 83 del envenenamiento de aguas, 89 sobre vertidos de hidrocarburos. Y finalmente, los artículos 91 y 92 sobre las infracciones a convenciones internacionales sobre contaminación por hidrocarburos.			
Normas sobre evaluación ambiental de actividades susceptibles a degradar el ambiente.	35.946	1.257	26/04/1996
Esta norma en el capítulo II, artículo 115 establece el procedimiento para actividades mineras y de hidrocarburos.			
CALIDAD AMBIENTAL			
Agua			
Ley de Aguas.	35.595		02/01/2007
En cuanto al control y manejo de los cuerpos de agua se contempla en los artículos 12 y 13. Y del uso de las aguas marinas en el artículo 74.			
Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos.	5.021E	883	18/12/1995

Tabla 9. Continuación			
En la sección IV, artículos 12 y 13 se establecen las condiciones sobre las descargas al medio marino-costero y en el artículo 29 sobre el régimen de adecuación de las descargas a estos medios.			
MATERIALES - DESECHOS PELIGROSOS			
Ley sobre sustancias, materiales y desechos peligrosos.	5.554		13/11/2001
El artículo 6 prohíbe la descarga de sustancias, materiales o desechos en los cuerpos de agua. En el artículo 13, establece la obligación de los responsables de generar, usar y manejar sustancias o materiales peligrosos. En los artículos 20 y 21, se establecen la conformación de un equipo para la orientación y formulación de políticas y estrategias para la regulación y control.			
Normas para el Control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos peligrosos.	5.212	2.635	12/02/1992
En el capítulo III, se contempla el manejo de los desechos peligrosos de actividades de exploración y producción de petróleo. Haciendo énfasis en las disposiciones técnicas para su manejo.			
ZONAS COSTERAS – ESPACIOS ACUATICOS E INSULARES			
Ley de Marinas y Actividades Conexas.	37.570		14/11/2002
En la sección IV sobre la prevención de la contaminación, en los artículos 93 a 95, se establece que el propietario del buque será el responsable de los daños ocasionados por contaminación.			
TRATADOS Y CONVENIOS INTERNACIONALES			
Contaminación por Hidrocarburos			
Cooperación para Combatir los Derrames de Hidrocarburos en la Región del Gran Caribe.	33.281		08/08/1983
El artículo 5 establece los procedimientos apropiados para la información sobre incidentes de derrames. Y en el artículo 7 las medidas operacionales para hacer frente a un incidente.			
Convención Internacional para impedir la Contaminación de las Aguas del Mar por los Hidrocarburos.	2.314 E		26/09/1969

Tabla 9. Continuación			
El objetivo de este convenio es tomar medidas para prevenir la contaminación de las aguas del mar por descargas de hidrocarburos desde buques.			
Convenio Internacional para prevenir la Contaminación por los Buques.	4.633 E		02/10/1983
Este convenio versa sobre la prevención de la contaminación del medio marino por los buques a causa de factores de funcionamiento o accidentales. En el anexo I, se plantean las reglas para prevenir la contaminación por hidrocarburos.			

CAPITULO 3

MARCO METODOLOGICO

En el presente capítulo se describe el conjunto de acciones destinadas para realizar el análisis al fondo del problema planteado, se define el tipo, nivel y diseño de la investigación, así como la población, las técnicas e instrumento de recolección de datos empleados para recabar información sobre las variables de estudio.

3.1. Tipo, nivel y diseño de investigación

De acuerdo a Arias (2006), la investigación del tipo experimental es “un proceso que consiste en someter a un objeto o grupo de individuos a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente)”. (p. 33). Este trabajo se caracterizó fundamentalmente, por la manipulación y control de variables durante el experimento (simulaciones a escala de laboratorio). De tal manera, de someter o manipular la variable independiente, para observar y medir a la variable dependiente. Así mismo, permitir controlar las variables intervinientes y externas.

El nivel de la investigación, se refiere al grado de profundidad con que se abordará el objeto de estudio en el trabajo. En esta investigación, el nivel fue explicativo, por cuanto su propósito es “demostrar que los cambios en la variable dependiente fueron causados por la variable independiente. Es decir, se pretende establecer con precisión una relación causa-efecto.” (Sampieri, Fernández-Collado y Baptista, 2006, p.108). De igual manera, Arias (2006), plantea que “los estudios explicativos pueden ocuparse tanto de las causas (investigación post facto) como de los efectos (investigación experimental)”. (p. 26)

El diseño de la investigación fue la estrategia que se desarrolló para obtener la información que se requirió en la investigación. Sampieri, Fernández-Collado y Baptista (2006) define a los diseños experimentales puros como:

> Aquellos que reúnen los requisitos para lograr el control y la validez interna: 1) grupos de comparación (manipulación de la variable independiente o de varias independientes) y 2) equivalencia de grupos. Pueden utilizar pruebas y pos pruebas para analizar la evolución de los grupos antes y después del tratamiento experimental. (p.188)

En el presente trabajo de investigación, el diseño fue experimental puro.

3.2. Sistema de Variables

Arias (2006), señala que el sistema de variables "es una serie de características definida de manera operacional, es decir, en función de sus indicadores o unidades de medidas''. (p.45). Las variables representan de forma resumida los objetivos específicos, sus dimensiones, indicadores y el instrumento utilizado para la ejecución de la investigación, representado en un mapa operativo. Además, las variables representan un símbolo que determinan un conjunto de observaciones y que pueden asumir cualquier valor, y permite manipular determinados resultados, mediante el uso de ciertos medidores. A continuación se presenta la conceptualización y operacionalización de las variables.

3.2.1. Definición conceptual

Toda ciencia elabora conceptos con el fin de describir y explicar la experiencia y comunicar el conocimiento adquirido. Al respecto, Sampieri, Fernández-Collado y Baptista (2006), expresa que se debe ''distinguir el concepto como una unidad de significado, del término o símbolo perceptible por medio del cual se expresa este

significado''. (p.163). En la tabla 10, se presenta la conceptualización de las variables de esta investigación.

Tabla 10. Identificación y conceptualización de las variables (Fuente: Elaboración propia, 2016)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL
Establecer la línea base del sistema marino donde se realizará las pruebas de simulación de derrame petrolero	Parámetros físico-químicos y bacteriológicos	Dato o factor que se toma como necesario para analizar o valorar una situación.
	Normativa legal aplicable	Conjunto de normas aplicables a una determinada materia o actividad.
Determinar la correlación entre parámetros analíticos robustos como elementos químicos asociados al crudo y la geoquímica orgánica convencional con los perfiles isotópicos del crudo a estudiar.	Fracción C_{15}+	Es la fracción que comprende el conjunto de parafinas e isoprenoides entre la parafina lineal C_{14} y la parafina lineal C_{32}
	Biomarcadores o marcadores geoquímicos	Son las moléculas orgánicas complejas correspondientes a productos naturales específicos constituidos por carbono, hidrogeno y otros elementos (O, S, N). Están presentes en extractos orgánicos obtenidos de sedimentos, rocas y crudos, y tienen una estructura similar al precursor biológico respectivo.
	Perfiles isotópicos de los compuestos individuales del crudo.	Conjunto de abundancias relativas de los isótopos estables de un elemento.
Evaluar las tendencias de los perfiles isotópicos del crudo, en función del tiempo de exposición, a la degradación microbiana en un simulador de sistemas marinos.	Perfiles isotópicos de los compuestos individuales del crudo (CSIA).	Conjunto de abundancias relativas de los isótopos estables de un elemento.
Comparar las tendencias de los perfiles isotópicos del crudo, en función del nivel de derrame (bajo, medio y alto), en un simulador de sistemas marinos.		
Comparar las tendencias de los perfiles isotópicos de crudos, en función de los diferentes tipos de crudos exportables en el país, en un simulador de sistemas marinos.		

3.2.2. Definición operacional

Arias (2006), señala que la definición operacional de la variable "representa el desglosamiento de la misma en aspectos cada vez más sencillos que permita la máxima aproximación para poder medirla, estos aspectos se agrupan bajo las denominaciones de las dimensiones, e indicadores". (p.18). En la tabla 11, se presenta la operacionalización de las variables, especificando las dimensiones operativas del trabajo de investigación y sus indicadores que permitirán medir con precisión dicha variable.

Tabla 11. Operacionalización de las Variables (Fuente: Elaboración propia, 2016)

VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADOR
Parámetros físico-químicos y bacteriológicos	Calidad	Valoración de las condiciones iniciales del sistema
Normativa legal aplicable	Leyes y normativas	Caracterización del sistema antes de ser intervenido
Fracción C_{15}^{+}	Información referencial usada en la Geoquímica Orgánica del Petróleo	Valoración del crudo a utilizar
Patrones de distribución y biomarcadores o marcadores geoquímicos		
Perfiles isotópicos de los compuestos individuales del crudo (CSIA).	Información isotópica referencial usada en la Geoquímica Orgánica del Petróleo	Caracterización de las tendencias de los perfiles isotópicos de los compuestos individuales

3.3. Población y Muestra

Arias (2006), define a la población de un estudio como "un conjunto de elementos, seres o eventos concordantes entre sí en cuanto a una serie de características, de los cuales se desea obtener alguna información". (p.30). De manera que, la población es la

totalidad del fenómeno a estudiar, donde las unidades de población poseen una característica común, la que se estudia y da origen a los datos de la investigación.

En este proyecto de investigación, la población a estudiar, correspondió a las relaciones isotópicas de crudos venezolanos con calidad de exportación. De manera que, la población en el estudio está definida de acuerdo a información extraída a través del portal electrónico oficial de PDVSA, en el año 2009 la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP) y PDVSA establecieron como crudos referenciales nacionales:

a) Para el mercado principal, el crudo de referencia es BCF – 17, crudo del área Bachaquero en Formación 17°API, crudo empleado para el cálculo de la cesta del petróleo venezolano y para la calidad del crudo nacional de exportación.

b) Para el mercado secundario, se reporta crudos pesados y extrapesados del Oriente y Faja Petrolífera del Orinoco, con valores que van desde 10 y 22° API.

Con respecto a la muestra, Arias (2006) la define como “un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible”. (p.83).

De manera que, la muestra que se empleó en este trabajo, es un crudo mediano no biodegradado (análogo a los crudos exportables venezolanos), que es utilizado como material de referencia interno en los laboratorios de PDVSA Intevep, el **crudo CX**, perteneciente al campo Corozo, Formación Naricual de la subcuenca de Maturín. En la tabla 12, se detallan las características del crudo.

Tabla 12. Características del crudo CX, empleado en las simulaciones experimentales (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

Parámetros	
Gravedad API	22
Hidrocarburos saturados (%)	54
Hidrocarburos aromáticos (%)	29
Resinas (%)	10
Asfaltenos (%)	7

Para realizar las simulaciones a escala de laboratorio de derrames marinos, fue necesario tener un sustrato natural adecuado, por lo que, se emplearon muestras de agua de mar recolectadas en la zona marino costera de la Planta de Distribución de Carenero, en el estado Bolivariano de Miranda, recolectadas en tres puntos diferentes: costa afuera (zona de desembarque de combustibles), manglar y planta de tratamiento de efluentes (PTE). En la tabla 13, se detallan los valores de los parámetros fisicoquímicos en cada punto muestreado (costa afuera, manglar y planta de tratamiento).

Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua de mar recolectadas (Fuente: Elaboración Propia)

Punto de muestreo	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (mS/cm)	Oxígeno Disuelto (mg/L)
Costa afuera	7,04	26,8	51,3	6,94
Manglar	7,30	28,1	53,1	5,35
Planta de tratamiento de efluentes PTE	7,37	28,3	2,6	3,37

Datum: WGS84

Zona: 19 N

En la figura 17, se presenta la ubicación geográfica en un mapa satelital de cada uno de los puntos de muestreo.

Figura 17. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo en planta de distribución Carenero (Higuerote, estado Bolivariano de Miranda)

3.4. Técnicas e Instrumentos de Recolección de datos

Arias (2006), define las técnicas de recolección de datos como “las distintas formas o maneras de obtener la información”. (p.111). En esta investigación de carácter experimental, la técnica de recolección de los datos se realizó a través de simulaciones controlada en el laboratorio, de un derrame petrolero con crudo venezolano en un sistema marino, basado en el modelaje análogo de escalamiento. Recolectándose muestras de este crudo en diferenciales de tiempo (a la exposición de la comunidad bacteriana), a las cuales se les analizaron: la microbiología del sustrato natural (agua marina rica en productividad bacteriana), SARA, fracción C_{15}^{+}, biomarcadores (saturados y aromáticos) y los CSIA, para establecer una escala de biodegradación y determinar una huella característica que permita fortalecer las ciencias forenses ambientales asociadas a los derrames petroleros.

Sampieri, Fernández-Collado y Baptista (2006), plantea que los instrumentos de medición son “los medios materiales que se emplean para recoger y almacenar la información”. (p. 277). Además, establece que “un instrumento de medición adecuado es aquel que registra datos observables que representan las variables del proyecto”. (p.278). En la tabla 14, se presentan las variables con sus respectivos instrumentos de medición.

Tabla 14. Variables del proyecto con sus respectivos instrumentos de medición (Fuente: Elaboración propia, 2016)

VARIABLES	INSTRUMENTO DE MEDICION
Parámetros físico-químicos	-Electrodo selectivo para pH, conductividad, oxígeno disuelto y temperatura.
Análisis microbiológico	-Prueba presuntiva y recuento microscópico.
SARA	-Gravimetría (diferencial de masas porcentual)
Fracción C_{15}+	- Cromatografía de gases con detector de FID (GC-FID).
Patrones de distribución y biomarcadores o marcadores geoquímicos	-Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS): para las relaciones de m/z de los diferentes biomarcadores.
Perfiles isotópicos de los compuestos individuales del crudo (CSIA).	-Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de relaciones isotópicas (GC-IRMS).

Un instrumento de medición para recolectar apropiadamente datos cuantitativos debe cubrir tres parámetros fundamentales: confiabilidad, validez y objetividad. Skoog, Holler y Nieman (2001), enumeran los criterios cuantitativos que pueden ser utilizados para garantizar una adecuada recolección de datos. Estas características se expresan en términos numéricos y se denominan parámetros de calidad. (p.12). A continuación se presenta en la tabla 15, los criterios números y los parámetros estadísticos de calidad**.**

Tabla 15. Criterios numéricos para la recolección de datos en instrumentales analíticos (Fuente: Skoog, Holler y Nieman, 2001)

CRITERIO	PARAMETROS DE CALIDAD
Precisión	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación y varianza.
Sesgo	Error absoluto sistemático y error relativo sistemático.
Sensibilidad	Sensibilidad de calibración y sensibilidad analítica.

Para garantizar la competencia en la realización de los ensayos y de las calibraciones, se empleó la norma ISO 17025:2005. En cuanto a la exactitud analítica, se utilizaron patrones de referencia certificados con características similares a la muestra. Se prepararon blancos bajo el mismo procedimiento de las muestras, cuando fue necesario, con el objeto de minimizar posibles errores de contaminación por reactivos, materiales de vidrios, etc. Para la trazabilidad de los instrumentales analíticos y de las mediciones se utilizaron materiales de referencia, patrones internacionales y patrones internos.

Adicionalmente, se efectuaron verificaciones intermedias durante los análisis, para mantener la confianza en el estado de las calibraciones de los patrones de referencia, materiales de referencia y patrones internos.

Con respecto al aseguramiento de la calidad y de acuerdo a lo contemplado en la norma, se emplearon la repetición de ensayos y calibraciones del mismo método, correlación de resultados para diferentes características y repetición de ensayos de materiales de referencia.

3.4.1. Instrumental analítico empleado

3.4.1.1. Análisis de hidrocarburos saturados (C_{15}^{+})

Para caracterizar y evaluar el mecanismo de biodegradación en las simulaciones a escala de laboratorio en cada diferencial de tiempo, se empleó el análisis de hidrocarburos saturados C_{15}^{+}. En la tabla 16, se describe la instrumentación para realizar el análisis de hidrocarburos saturados C_{15}^{+}. El equipo está provisto de un sistema de inyección tipo "*split*" acoplado a una columna capilar DB-1 utilizando helio como gas de arrastre con flujo de 25 mL/min y detección FID (*Flame Ionization Detector* por sus siglas en inglés). La introducción de la muestra se realizó de forma manual.

Tabla 16. Instrumentación utilizada para el análisis de hidrocarburos saturados C_{15}^{+} (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

Instrumentación	Marca o fabricante	Modelo
Cromatógrafo de gases	*HEWLETT PACKARD*	6890

3.4.1.2. Análisis de Biomarcadores saturados y marcadores aromáticos

El análisis de biomarcadores saturados se realizó con un cromatógrafo de gases provisto de una columna capilar DB-1 de baja polaridad acoplada a un espectrómetro de masas configurado en registro selectivo de iones. En el caso del análisis de biomarcadores aromáticos se utiliza una columna capilar DB-5. En la tabla 17, se describe el instrumental empleado:

Tabla 17. Instrumentación utilizada para el análisis de biomarcadores saturados y aromáticos (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

Instrumentación	Marca o fabricante	Modelo
Cromatógrafo de gases	*AGILENT TECHNOLOGIES*	6890N
Espectrómetro de masas cuádruplo	*AGILENT TECHNOLOGIES*	5973 Inert

3.4.1.3. Análisis de las relaciones isotópicas de los compuestos individuales de carbono en la fracción saturada (CSIA)

La tabla 18 muestra la instrumentación utilizada en el desarrollo de la metodología experimental, la cual consistió primordialmente en tres componentes, el primero conocido como periférico el cual facilita la introducción de la muestra y en este caso particular es el cromatógrafo de gases (GC) debido a que la muestra es líquida, el segundo componente es la interfase la cual permite la comunicación entre el periférico y el IRMS, además de evitar la caída de presión y controlar el flujo y por último el IRMS que actúa como detector y es donde se realiza la determinación de las relaciones isotópicas, todo estos componentes en su conjunto son conocidos como GC-IRMS.

Tabla 18. Instrumentación utilizada para el análisis de los CSIA (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

Instrumentación	Marca o fabricante	Modelo
Cromatógrafo de gases (GC) (Periférico)	Thermo Scientific	Trance GC ultra
Espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS) (Detector)	Thermo Scientific	Delta V plus
Interfase	Thermo Scientific	GC combustion-III

3.4.2. Procedimiento Experimental

3.4.2.1. Diseño de experimentos de las simulaciones controladas a escala de laboratorio de biodegradación

En esta primera fase experimental se utilizó el diseño factorial, que permite evaluar un conjunto de factores, variables o parámetros sobre una respuesta experimental determinada. Dicha herramienta es empleada para establecer cuáles de los parámetros individuales o combinación de éstos, tienen mayor efecto o peso en la respuesta experimental, simplificando así la cantidad de experimentos planteados para validar la hipótesis.

Particularmente, en esta investigación, los parámetros que pueden modificar las propiedades fisicoquímicas medibles en el hidrocarburo derramado en medio marino son múltiples, e igualmente los procesos de alteración o fenómenos que ocurren como biodegradación, foto-oxidación, disolución, evaporación y enriquecimiento de ceras, como se detalla en la figura 18.

Después de la valoración de los fenómenos, por ser originados por múltiples variables y para simplificar el desarrollo experimental, se determinó que la biodegradación tienen mayor impacto en la respuesta de manera individual, por ser el proceso promovido esencialmente por las bacterias, siendo inequívoca la respuesta en las propiedades medibles, mientras que, los demás procesos de alteración como la foto-oxidación, evaporación y disolución son fenómenos que los catalizan la misma variable o parámetro como lo es la energía solar, resultando difícil establecer la contribución de cada uno en la respuesta.

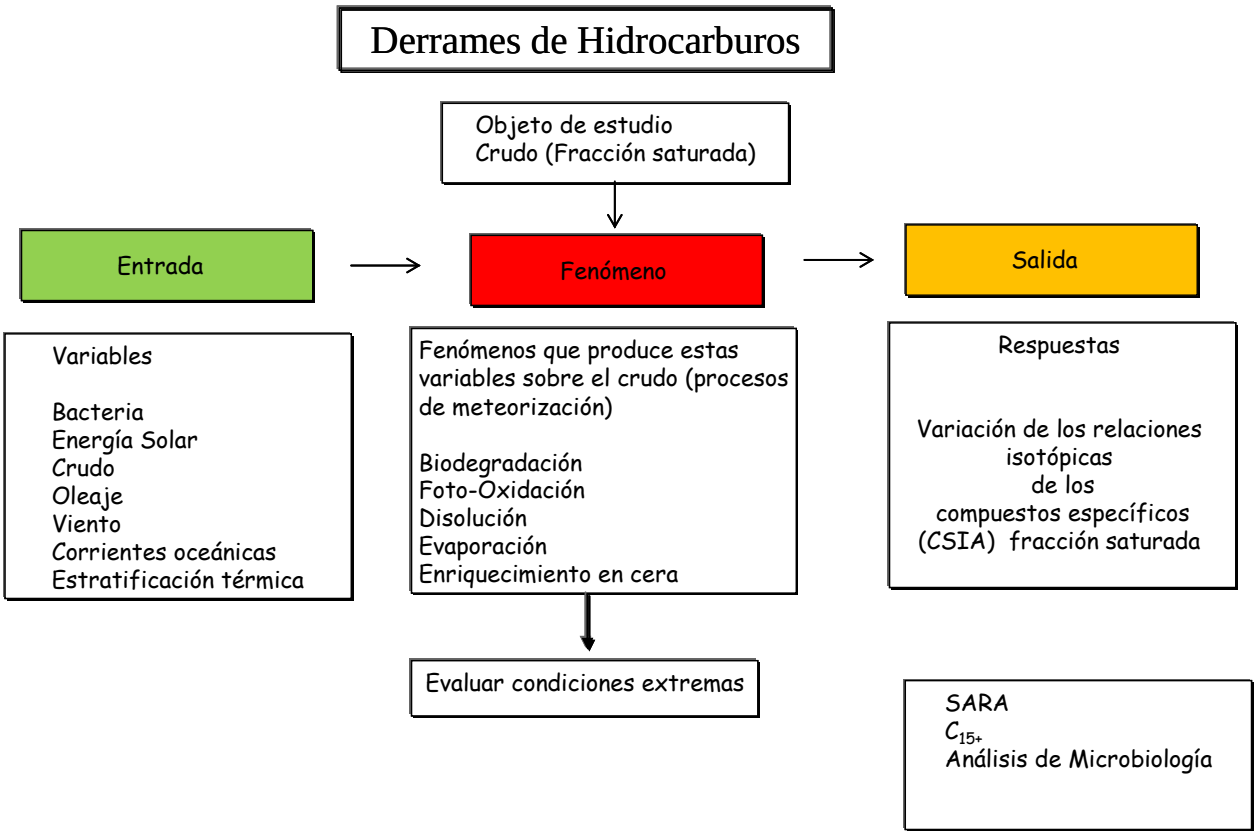

Figura 18. Conceptualización de los diferentes procesos de alteración a los que son sometidos el crudo derramado en mar (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Para evaluar el proceso de biodegradación, es importante minimizar los otros procesos de manera de establecer que cualquier respuesta observada en las propiedades medibles sea producto de la biodegradación del crudo. Para ello, es necesario garantizar que las bacterias sean resilientes al colocarlas en contacto con el hidrocarburo, además que lo asuman como fuente energética en su proceso metabólico y pueden sobrevivir y desarrollarse en estas nuevas condiciones.

Esto evidencia la importancia que tiene la elección de la fuente de bacterias apropiadas, la cual suministra de manera natural el agua de mar, especialmente en zonas que han estado expuestas a la presencia de hidrocarburos, como es el caso de la Planta de Distribución de Carenero, localizada en la ciudad de Higuerote, estado

Bolivariano de Miranda, donde se ha desarrollado especies bacterianas y su suministro energético es proporcionado por los hidrocarburos derramados propios de la actividad de descarga de combustible.

Por consiguiente, se diseñaron los experimentos en función de garantizar la actividad metabólica de las bacterias en el proceso de biodegradación, para esto se consideraron los conceptos básicos de bioaumentación (aumento de la concentración bacteriana) y bioestimulación (activación metabólica); los cuales son determinantes en el diseño factorial de la matriz experimental $\mathbf{2^2}$, como se observa en la tabla 19. En cuanto a las propiedades fisicoquímicas del agua de mar (pH, temperatura, oxígeno disuelto y conductividad), se consideran constantes y se registraron por 180 días.

Tabla 19. Matriz de diseño factorial de las simulaciones (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Factores		**Bioestimulación**	
		1	**2**
Bioaumentación	**1**	(1,1)	(1,2)
	2	(2,1)	(2,2)

El valor 1 expresa ausencia del factor y el 2 expresa presencia del factor

3.4.2.2. Simulaciones controladas a escala de laboratorio para evaluar las condiciones óptimas de biodegradación en un derrame de crudo

Fundamentalmente, la matriz experimental está basada en diseño factorial 2^2, la primera etapa es la condición (1,1) que establece las condiciones originales del sistema natural para que ocurra el proceso de biodegradación, sin agregarle ningún aditivo, dichas condiciones son las reflejadas en la tabla 20, experimento 1, donde se colocaron las diferentes aguas recolectadas (manglar, costa afuera y PTE) en contacto con el

crudo **CX**. Para esto, se agregaron 100 mL de cada una de las aguas en diferentes fiolas y se le añadieron 2 mL de crudo. Luego, se colocaron a 25°C con agitación a 120 rpm durante períodos de 1, 3, 5, 7, 9, 12 y 14 días, que son los tiempos en que se toman las muestras de agua de la simulación, para posteriormente realizar la incubación de las bacterias para su cuantificación y la toma de las muestras de crudo a diferentes tiempos para el posterior análisis de SARA, C_{15}^{+}, biomarcadores saturados y aromáticos y CSIA.

A partir del experimento 2 (Tabla 20), se comenzó a emplear la bioaumentación para promover el proceso de biodegradación, donde se añadió 100 µL de un inóculo proveniente de las bacterias de la planta de tratamiento (PTE), las cuales se va modificando en el transcurso del experimento por un inóculo provenientes de las bacterias que mejor se adaptaron de los días anteriores, en el experimento 3, la bioestimulación se realizó agregándole 1 mL de acetato de sodio al 50% como activador metabólico. Finalmente, para el experimento 4 es la suma de la bioaumentación (inoculación) y bioestimulación (activador metabólico). Para todos los experimentos se utilizó el agua recolectada en costa afuera de la zona de Carenero.

Es importante resaltar que, a partir de los resultados de esta batería de experimentos, se determinó la mejor condición experimental para garantizar la biodegradación del crudo, resultando el experimento 4 como la condición experimental más favorable (donde se bioaumenta y bioestimula el sistema).

Tabla 20. Condiciones experimentales en la simulación del proceso de biodegradación a escala de laboratorio en derrames marinos (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

N°	Experimentos	Agua de mar	Crudo	Inoculación	Activador metabólico
(1, 1)	Condiciones originales	Costa afuera Manglar PTE (100 mL)	CX (2mL)		
(1, 2)	Bioaumentación	Costa afuera Manglar PTE (100 mL)	CX (2mL)	Bacterias (PTE) (100 µL)	
(2, 1)	Bioestimulación	Costa afuera Manglar PTE (100 mL)	CX (2mL)		Acetato de sodio (1mL – 50%)
(2, 2)	Bioaumentación + bioestimulación	Costa afuera (100 mL)	CX (2mL)	Bacterias (PTE) (100 µL)	Acetato de sodio (1mL – 50%)

En la tabla 21, se especifican las condiciones más favorables indicadas en el diseño factorial con la combinación (2, 2). Dicha combinación permite desarrollar de manera efectiva el proceso de biodegradación, durante la simulación a escala de laboratorio. Estas condiciones óptimas están reflejadas en el experimento 4, realizado anteriormente, por ende, se replicó las mismas en una mayor cantidad de tiempo, aumentándolo de 14 a 63 días como tiempo máximo de contacto agua-crudo, es decir, 4,5 veces garantizando un mejor seguimiento del fenómeno estudiado. Además, es importante resaltar que cada 3 semanas (21 días), se realizó la recolección de

muestras de agua y crudo, para sus posteriores ensayos microbiológicos, fisicoquímicos y moleculares.

Tabla 21. Condiciones experimentales óptimas para el desarrollo del proceso de biodegradación en la simulación a escala de laboratorio de derrames de crudo en medio marino (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Condición experimental	**Agua de mar**	**Crudo**	**Inoculación**	**Activador metabólico**	**Duración (semanas)**
Bioaumentación + Bioestimulación	Costa afuera (100 mL)	**CX**	Bacterias (PTE) (100 µL)	Acetato de sodio (1 mL – 50%)	3 (21 días)
					6 (42 días)
					9 (63 días)

En la figura 19, se presenta el montaje de las simulaciones por semanas, donde se puede apreciar las fiolas con el agua de mar (costa afuera), crudo (**CX**) y la inoculación inicial con bacterias de PTE, y a partir de la semana 3 con inóculos provenientes de las bacterias que mejor se adaptaron de las semanas anteriores, además, el acetato de sodio. Es importante señalar, que todos los ensayos se realizaron por triplicado, incluyendo los blancos, donde se emplearon agua destilada.

Figura 19. Montaje de las simulaciones controladas en el laboratorio, por semana. En la parte derecha, se observan las muestras control (agua destilada y crudo) para cada diferencial de tiempo (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Es importante resaltar, que para el cumplimiento de los objetivos planteados en el estudio, se realizaron las simulaciones en dos fases: en el año 2017 se realizaron simulaciones de 15 semanas y para buques de baja capacidad de carga de hidrocarburos; mientras que durante el año 2018 se replicaron las simulaciones pero aumentando 5 veces el volumen del crudo derramado, lo que permitió evaluar los derrames marinos de buques de alta capacidad de carga (se realizaron en un tiempo de 12 semanas).

3.4.2.3. Cuantificación bacteriológica

A los experimentos realizados en la sección 3.4.2.2, se le realizaron seguimiento del crecimiento bacteriano mediante la cuantificación bacteriológica al agua, antes y después de colocarla en contacto con el crudo y los aditivos (bioaumentación y bioestimulación), que se le agregaron para mejorar el proceso de biodegradación los

periodos de seguimiento o toma de muestra variaban desde 1 a 63 días, dependiendo del cronograma del experimento, y este procedimiento permite valorar la presencia de bacterias en el medio marino y su concentración en cada experimento.

El recuento de colonias o cuantificación bacteriológica se realiza en placas con agar nutritivo, de acuerdo a los procedimientos descritos en las normas estándares ISO 6222 e ISO 8199 (Figura 20). El método (método *Spread*) consiste en la estimación del número de bacterias cultivables en una muestra mediante transferencias sucesivas a una serie de tubos de ensayo con solución salina estéril, usando diluciones de 1:10 en cada uno. En la figura 21, se puede observar las respectivas diluciones que se realizaron.

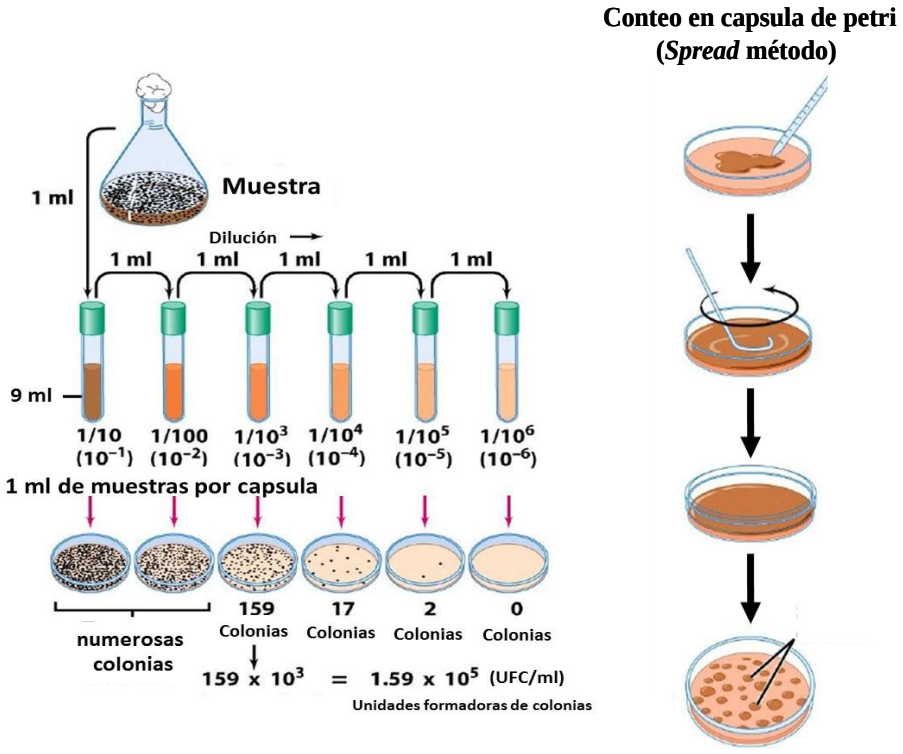

Figura 20. Esquema general para el recuento bacteriológico (método *Spread*) de acuerdo a las normas ISO 6222 e ISO 8199 (Fuente: Madigan y otros, 2004, p. 40)

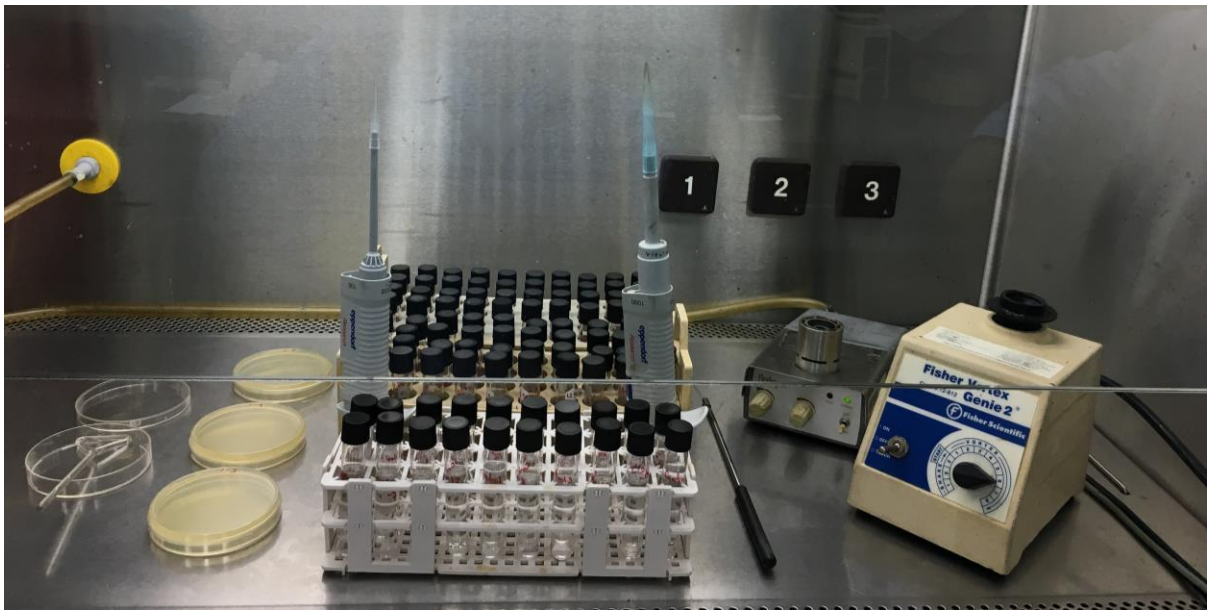

Figura 21. Sistema de diluciones para la cuantificación bacteriológica (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Luego, se transfirieron 100 µL de cada dilución a una cápsula de *Petri* con el medio de cultivo sólido y se sembró la muestra con el uso de un rastrillo de vidrio previamente esterilizado con alcohol a la llama, seguido de un período de incubación en condiciones aeróbicas a 30°C. El número de colonias en las cápsulas proveen un estimado del número de bacterias presentes en la muestra original. La validación estadística de esta prueba es realizada con réplicas. El resultado se reporta en unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra (UFC/mL). En la figura 22, se presenta las placas o capsulas con el crecimiento bacteriológico evidente, una semana antes de derramarse el crudo y ser sometido a biodegradación.

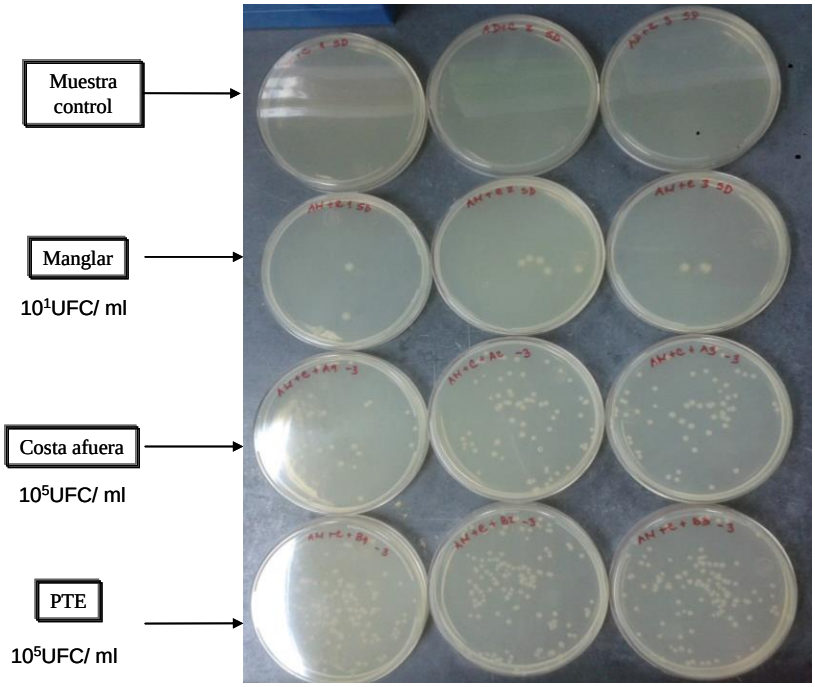

Figura 22. Cuantificación bacteriológica. En las capsulas de *Petri*, se observa el crecimiento bacteriológico evidente (una semana antes del derrame) (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Finalmente, se representa en una gráfica la curva del crecimiento microbiano, que representa la evolución del número de células viables presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo del tiempo de estudio. Se estudia el número de células viables por mililitro de un cultivo de volumen limitado y con una cantidad de nutrientes limitada, como por ejemplo un medio de cultivo líquido en una fiola que ha sido inoculado con una cantidad inicial de microorganismos o inóculo (Madigan y otros, 2004).

3.4.2.4. Deshidratación de crudo

Una vez recolectada las muestras de crudo de los diferentes experimentos, se realizan la debida preparación previa a los análisis químicos. Se disuelve la muestra de crudo en diclorometano. La cantidad de solvente a agregar con respecto a la muestra es aproximadamente en una relación 1:1 v/v. Se añadió suficiente cantidad de sulfato de magnesio, hasta que no se observe burbujeo, agitar con una varilla de vidrio. Luego de media hora se filtra. El filtrado de la muestra es a través de un papel de filtro tipo cualitativo, para eliminar el sedimento y el sulfato de magnesio. Posteriormente, se evapora el solvente a 40°C. Finalmente, transferir el crudo deshidratado a un vial de 20 mL. Dejándose secar a temperatura ambiente.

3.4.2.5. Análisis SARA

Uno de los análisis químicos empleados para evaluar los cambios moleculares del crudo es la separación SARA. El primer paso es la precipitación de los asfaltenos, para ello, los asfaltenos son precipitados añadiendo heptano en una proporción 40:1 v/v heptano/muestra. La mezcla es sometida a agitación usando un baño con ultrasonido durante 20 min. Luego, se deja en reposo y en refrigeración por 12 horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo los asfaltenos son separados de los maltenos (saturados, aromáticos y resinas) mediante centrifugación durante 15 min.

Los maltenos son extraídos con mucho cuidado utilizando una pipeta *Pasteur* y trasvasados cuantitativamente a viales de 20 mL. Los asfaltenos se cuantifican luego de dejar evaporar el solvente en exceso durante 24 horas. Luego, se procede a la separación de los maltenos mediante cromatografía de absorción en columna. Debido a la poca cantidad de muestra, la cromatografía se lleva a cabo en unas buretas con un

largo de 20 cm de largo con llaves, éstas se empaquetan con alúmina activada suspendida en hexano.

Una vez sembrada en la bureta la muestra (entre 0,2000 – 0,5000 g), los hidrocarburos saturados son eluídos con 15 mL de hexano. Posteriormente, se separan los hidrocarburos aromáticos usando 15 mL de tolueno como eluyente. La elución de los aromáticos se le realiza seguimiento con una lámpara de luz UV debido al efecto de fluorescencia que genera esta fracción. Por último, se eluyen las resinas usando 20 mL de una mezcla tolueno-metanol en relación 70:30 v/v.

Cada una de las fracciones son eluídas directamente en viales previamente pesados y una vez contenida la fracción se deja evaporar a temperatura ambiente hasta sequedad para ser cuantificadas. En la figura 23, se presenta el sistema empleado para la separación de las fracciones, en este caso, se observa la elución de las resinas con la mezcla tolueno-metanol.

Figura 23. Montaje de la cromatografía de absorción en columna para la separación de las fracciones del crudo (separación de la fracción de resinas) (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

3.4.2.6. Análisis de hidrocarburos saturados C_{15}^{+}

Es otra de las herramientas analíticas que se pueden emplear, permite evaluar el avance efectivo en los cambios moleculares del crudo en las simulaciones. Este análisis se realiza en el Laboratorio de Geoquímica Orgánica. Para ello, se prepara las soluciones de la fracción de hidrocarburos saturados a una concentración de $1x10^{-5}$ g/L a partir de su concentración inicial, sí la fracción posee un peso mayor a 9,5 mg, se diluye en diclorometano. Si el peso es menor a 9,5 mg se toma toda la muestra con una pequeña cantidad de diclorometano y se coloca en un inserto con pie de polímero. Al tener las soluciones preparadas de las fracciones de hidrocarburos saturados, se procede a inyectar 0,2 µL de muestra en el equipo.

Las muestras inyectadas se rotoevaporan rápidamente y son llevadas hacia la columna por un gas de arrastre. Como resultado de diferencias de presiones de vapor con respecto a la fase líquida y a diferencias de solubilidad o afinidad con esta última los compuestos se separan. La velocidad de desplazamiento de una molécula particular a lo largo de la columna depende de cuánto tiempo se mantenga en la fase vapor (en la cual puede ser arrastrada hacia el detector) y cuánto tiempo permanezca inmóvil en la fase estacionaria.

A medida que los compuestos emergen de la columna se determinan con un detector de ionización a llama (*FID*, por sus siglas en ingles) y producen una señal directamente proporcional a su concentración en la muestra. La identificación de los picos se lleva a cabo por comparación de los tiempos de retención con los de un patrón conocido. El integrador acoplado al *FID* proporciona los valores de las áreas bajo los picos, las cuales son utilizadas en su cuantificación.

3.4.2.7. Análisis de biomarcadores saturados y marcadores aromáticos

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es un método que combina las características de cromatografía de gases y espectrometría de masas para la identificación de la familia de compuestos, en este caso, biomarcadores de los hidrocarburos saturados y aromáticos.

El GC-MS está constituido por dos componentes básicos: un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masas. El cromatógrafo de gases utiliza una columna capilar donde ocurre la separación de los componentes de las fracciones saturados y aromáticos. La diferencia de las propiedades químicas de las diferentes moléculas contenidas en la fracción saturada o aromática hace que sean separadas cuando la muestra cruza la longitud de la columna eluyendo a diferentes tiempos de retención. Eso permite al espectrómetro de masas capturar, ionizar, acelerar, desviar y detectar las moléculas ionizadas de forma separada. Para realizar esto, el espectrómetro de masas divide cada molécula en fragmentos ionizados y detecta estos fragmentos mediante su relación masa–carga (m/z).

3.4.2.8. Análisis de las relaciones isotópicas de los compuestos individuales de carbono en la fracción saturada (CSIA)

La primera fase consistió en realizar la conexión de la columna capilar OV1 en el cromatógrafo de gases (GC) y seguidamente las adecuaciones del mismo y del espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS), con el objetivo de ajustar las señales de las líneas bases de H_2O, N_2, O_2 y Ar, además, de alcanzar las condiciones de alto vacío.

Por otro lado, el pre - tratamiento de la muestra consistió en pesar una cantidad de la fracción saturada de cada muestra y diluirla en hexano. Fueron inyectados 5µl de la fracción saturada en el equipo de GC-IRMS. Empezando el recorrido del mismo en el puerto de inyección donde es volatilizada la muestra, para después ser separados los n-alcanos desde C_{15} hasta C_{32} incluyendo los isoprenoides Pr (pristano) y Ph (fitano) en la columna capilar, eluyendo los componentes individuales separados hasta un reactor

de oxidación en el mismo orden de su tiempo de retención, donde son oxidados cada uno produciéndose CO_2, NO_X y H_2O, consecutivamente pasan a un reactor de reducción donde los NO_x son trasformados en N_2 y además elimina un posible exceso de O_2. Posteriormente la corriente de los productos pasa a través de una trampa de agua que contiene una membrana tubular llamada NAFION la cual es la responsable de remover el H_2O y, finalmente la muestra es introducida al IRMS, mediante un sistema de open Splitl, de manera de analizar las relaciones isotópicas de Carbono en forma de CO_2 de cada uno de los compuestos separados, donde paralelamente son introducidos los pulsos de referencia vía dual-inlet en el propio IRMS.

El procedimiento general detallado para las simulaciones controladas en el laboratorio del proceso de biodegradación marina y los análisis orgánicos realizados, es esquematizado en la figura 24.

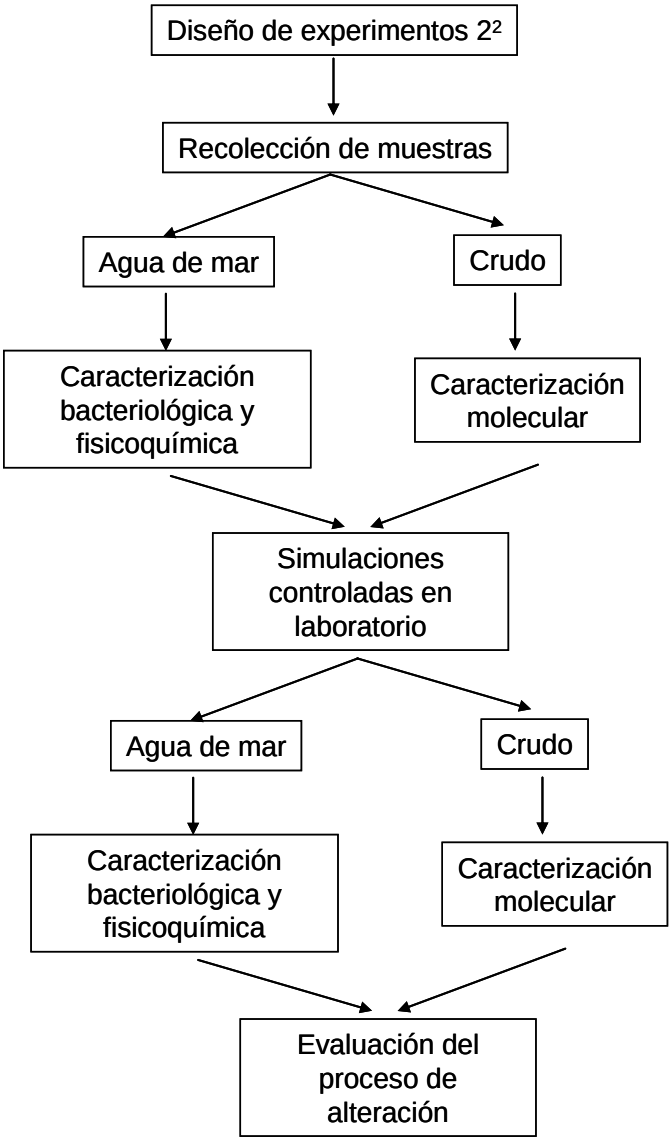

Figura 24. Esquema general detallado para las simulaciones controladas en el laboratorio del proceso de biodegradación marina (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

3.5. Factibilidad de la investigación

3.5.1. Recursos Humanos

En relación a los expertos, especialistas, analistas se logró formar un equipo multidisciplinario entre la empresa PDVSA-Intevep, Facultad de Ciencias–Universidad Central de Venezuela (Instituto de Zoología Tropical e Instituto de Ciencias de la Tierra) y el Departamento de Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Católica Andrés Bello, de diferentes áreas de ciencias básicas como biología, química y geoquímica para revisar todos los aspectos técnicos y operacionales que permitió cumplir de manera exitosa los objetivos específicos planteados en el trabajo de investigación.

3.5.2. Recursos Materiales

Los equipos de computación, instrumentales analíticas, materiales para los procedimientos químicos y físicos de preparación y análisis de las muestras, accesorios y material de oficina, fueron aportados por la empresa PDVSA - Intevep.

3.5.3. Recursos Financieros

El proyecto contó con el financiamiento en su totalidad por la empresa PDVSA - Intevep.

CAPITULO 4

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el presente capitulo, se presentan los resultados del proceso de la investigación, orientado básicamente a establecer la herramienta de los CSIA como una técnica confiable y practica en las ciencias forenses ambientales, de acuerdo a los objetivos establecidos en la investigación.

Este capítulo, está constituido por la tabulación de los datos obtenidos de las diferentes instrumentales analíticas empleados para analizar a la muestra, seguida de la representación gráfica de la distribución de tales resultados y la interpretación de las tendencias. A continuación y una vez aplicados los respectivos análisis se procesan los datos correspondientes con la finalidad de lograr los objetivos específicos de la investigación.

Objetivo 1. Establecer la línea base del sistema marino donde se realizarán las pruebas de simulación de derrame petrolero

Para establecer las condiciones iniciales del sistema donde se realizó un diseño de experimentos de $2^{2.}$ El diseño factorial arrojó cuatro (4) baterías de experimentos como se mostró en la tabla 19 del apartado *3.4.2.1.* del capítulo anterior. Es importante destacar que durante la investigación, se realizaron mediciones diarias de los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, oxígeno disuelto y conductividad) al agua de mar, con el objeto de tener un registro de los 180 días de trabajo experimental, observándose valores promedios sin variaciones significativas que pudieran alterar los resultados obtenidos. En la tabla 22 se muestran los promedios medidos y los valores históricos encontrados en la literatura para el agua de mar de la zona de Carenero.

Tabla 22. Promedios de los parámetros fisicoquímicos del agua de mar de Carenero previo a las simulaciones (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Parámetro fisicoquímico	Promedio	Histórico teórico (Castillo y otros, 2011)
pH	7,4 ± 0,4	7,9 ± 0,5
Temperatura (°C)	21,5 ± 2,0	28,8 ± 2,3
Oxígeno Disuelto (mg/L)	7,3 ± 0,7	7,3 ± 2,8
Conductividad (mS/cm)	54,0 ± 2,0	51,3 ± 6,9

Con respecto al desarrollo y crecimiento microbiano durante las simulaciones realizadas, a continuación se presentan los resultados obtenidos:

- *Condiciones originales:* En la figura 25, se observa que en las muestras se obtuvieron concentraciones iniciales en el orden de 10^3 UFC/mL para el manglar, costa afuera de 10^4 UFC/mL y para la PTE 10^6 UFC/mL. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo, el contenido de bacterias en cada agua disminuyó entre uno y dos órdenes de magnitud. De manera, que no se tiene un consorcio de bacterias capaces de resistir a la presencia del crudo.

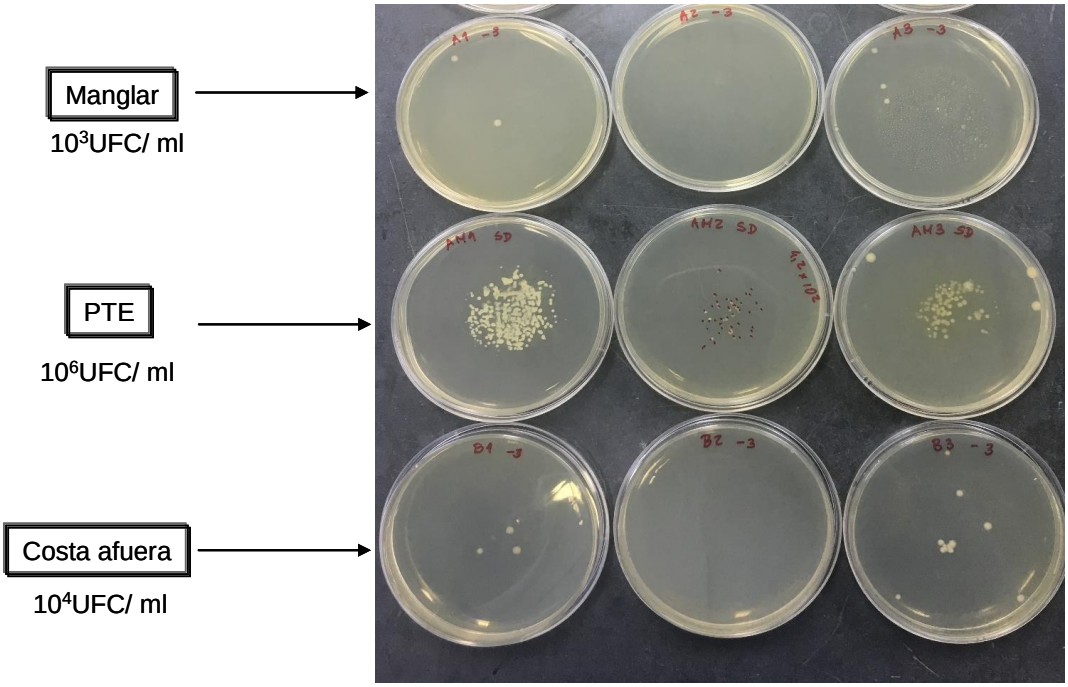

Figura 25. Cuantificación bacteriológica inicial. En las capsulas de *Petri*, se observa el crecimiento bacteriológico (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Sin embargo, se aprecia que el consorcio de bacterias más abundantes se presentó en el agua de la PTE, además que su disminución fue en un solo orden de magnitud y sostenida así durante los 14 días de experiencia, manteniendo concentraciones significativamente altas comparadas con las otras, sugiriendo la potencialidad de estas cepas para adaptarse a la presencia de hidrocarburos.

No obstante, las bacterias del agua de mar de costa afuera muestran una mejor adaptabilidad al comparar con las de manglar, como se aprecia en la figura 26, donde después de los 7 días, se observa un comportamiento constante, de manera que tanto las de costa como las de PTE se visualizan para el desarrollo bacteriana y como los potenciales cultivos para la bioaumentación en los subsiguientes experimentos.

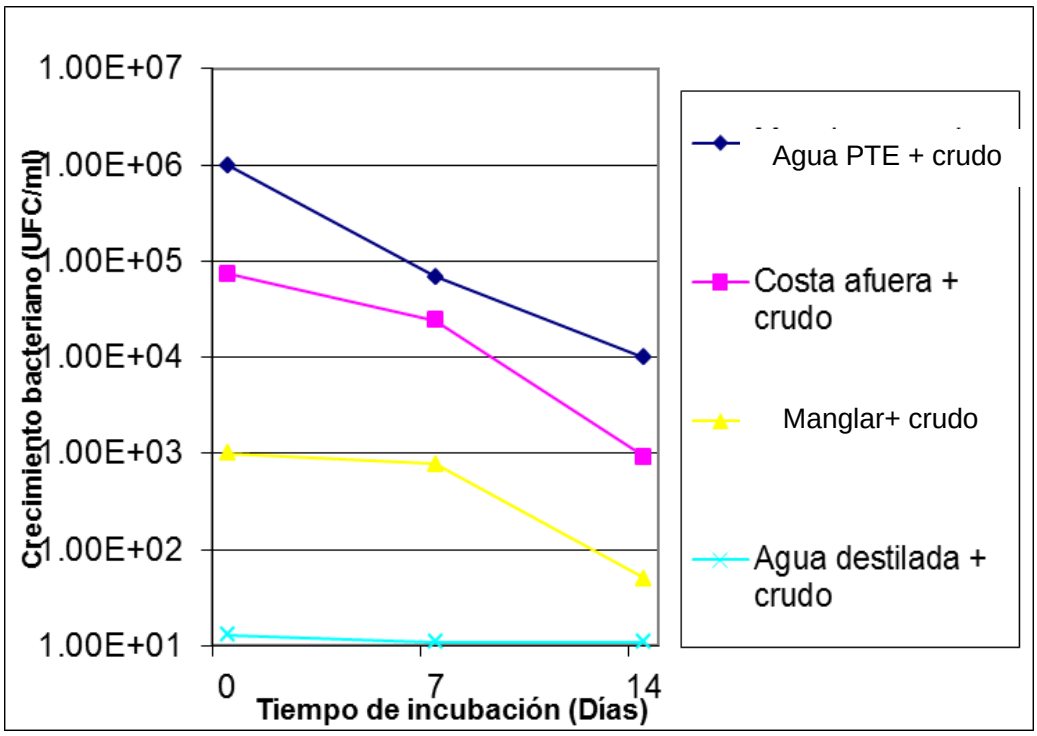

Figura 26. Concentración de bacterias después del derrame con el crudo durante 14 días. La línea con asterisco cercana al eje de las coordenadas X, representa los controles con agua destilada con crudo (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

- *Sistema con bioaumentación:* En la figura 27, se presentan los resultados obtenidos, esta prueba se realizó recolección de muestra de agua cada dos (2) días, observándose; que luego de efectuada cada bioaumentación, que originalmente comenzó con la inoculación con las bacterias provenientes de la PTE y después con las bacterias resilientes de días anteriores; un incremento en las concentraciones de bacterias por lo menos en una cifra significativa, sin embargo, se observaron fluctuaciones indicando inestabilidad en el sistema bacteriano.

Es importante destacar, que con las dos primeras experiencias, se obtuvieron del agua de la planta de tratamiento PTE, un consorcio de bacterias que demostraron poseer potencial resiliente y en magnitud considerable, por lo que para la última batería de experimentos, se procedió a emplear este consorcio en las simulaciones.

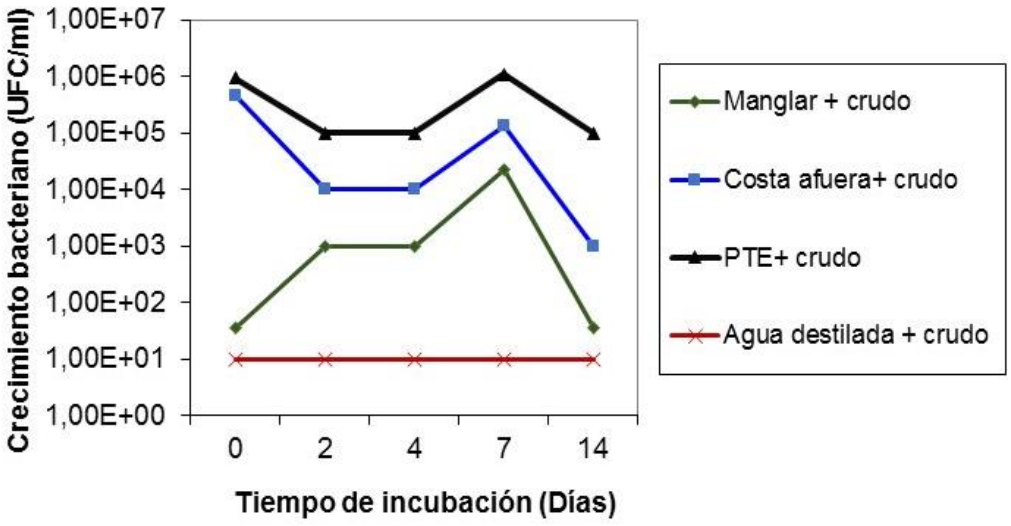

Figura 27. Concentración de bacterias del derrame de crudo durante 14 días. La línea con asterisco sobre el eje de las coordenadas X, representa los controles con agua destilada y crudo (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Con respecto a la tercera batería de experimentos; la condición (1,2) del diseño factorial, donde sólo se realizaría bioestimulación fue desestimada, debido a que se esperaba un comportamiento similar en las bacterias al obtenido en este experimento, porque las referencias bibliográficas revisadas en esta investigación, indican que los efectos de la bioaumentación y bioestimulación, tienen una influencia análoga en las bacterias cuando actúan por separados, además, de la necesidad del ahorro de reactivos y material, por lo que se procedió al cuarto y último experimento.

- *Sistema con bioaumentación y bioestimulación:* Para este experimento se seleccionó como único sustrato natural, el agua de mar de costa afuera, debido a que en los experimentos anteriores, las bacterias contenidas en ésta, mostraron la mejor adaptación al contacto con el crudo CX.

En la figura 28, se observa la curva de crecimiento bacteriano, con concentraciones iniciales microbianas que oscilan en el orden de 10^6 UFC/mL, viéndose un lento descenso poblacional significativo (hasta 10^5 UFC/mL), indicando que la combinación (2,2) del diseño factorial, es la más favorable para el proceso de biodegradación, cuando se compara con las concentraciones bacterianas (UFC/mL) obtenidas en los experimentos anteriores.

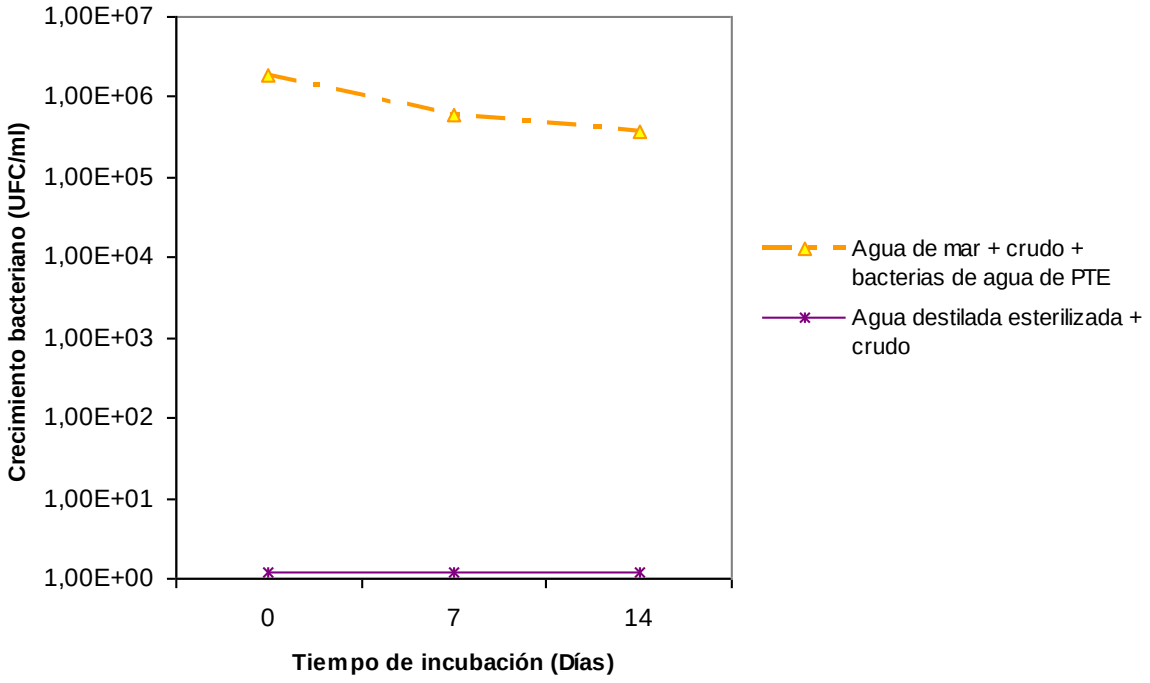

Figura 28. Concentración de bacterias después del derrame simulado durante 14 días. La línea con rombos sobre el eje de las coordenadas X, representa los controles con agua destilada y crudo (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Basado en los resultados de este experimento, donde se determinó que el agua de costa afuera es el mejor sustrato natural, con la proporción del 2% de crudo CX con respecto al agua; y la combinación de la bioaumentación (inoculación sucesiva partiendo de las bacterias de PTE) y bioestimulación (acetato de sodio como activador metabólico) son las condiciones más favorables para simular el proceso de biodegradación en derrames marinos de crudo. Se procedió a realizar una extensión

del tiempo en el subsiguiente experimento, debido a que el tiempo de evaluación del fenómeno era relativamente corto (14 días), por lo que se prolongó el estudio a 9 semanas (63 días), recolectando muestra de agua y crudo cada 3 semanas (21 días), de manera de observar en un tiempo más largo los efectos de la biodegradación sobre el crudo y la capacidad de seguimiento de las diferentes técnicas analíticas utilizadas.

En la figura 29, se observa la curva de crecimiento bacteriano con la extensión del tiempo del experimento, puede identificarse 3 segmentos bien marcados. El primero de pendiente negativa, que va desde el tiempo 0 a 3 semanas, comienza con la concentración más alta de bacterias que oscilan en el orden de 10^6 UFC/mL, ocurriendo una reducción significativa poblacional a medida que se aproxima a la tercera semana entre 10^1 y 10^2 UFC/mL. En este periodo impera el principio darwiniano de la supervivencia del más apto (resistencia – eliminación de grupo de bacterias). En el segundo segmento, que va desde la semana 3 a la 6, es el tiempo de adaptación del grupo de bacterias resistentes o sobrevivientes de la primera fase y tiene un comportamiento aproximadamente constaste en la concentración bacterial, incrementándose levemente cuando se avecina la semana 6. Por último, el tercer segmento, se observó una pendiente positiva (período de reproducción), aumentando la concentración bacteriológica, donde ocurrió una selección efectiva de bacterias capaces de resistir, adaptarse y multiplicarse en presencia de hidrocarburos (resiliencia).

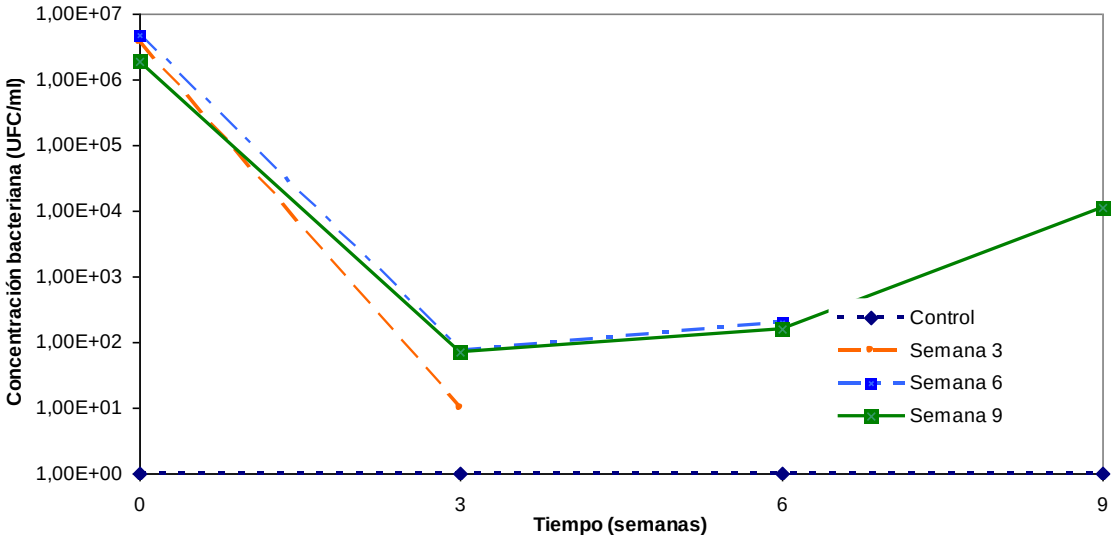

Figura 29. Concentración de bacterias después de interaccionar con el crudo a diferentes tiempos. La línea con rombos sobre el eje de las coordenadas X, representa los controles con agua destilada y crudo (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Una vez establecido las condiciones iniciales del sistema marino para las simulaciones, durante el primer año (2017), se realizaron simulaciones de derrames para buques o tanqueros de baja capacidad de carga de hidrocarburos. Posteriormente, se replicaron las simulaciones a escala de laboratorio, en el año 2018, pero aumentando 5 veces el volumen del derrame, permitiendo simular derrames petroleros marinos de tanqueros de alta capacidad de carga.

Objetivo 2. Determinar la correlación entre parámetros analíticos robustos de la geoquímica orgánica convencional con los perfiles isotópicos del crudo a estudiar

Para cubrir completamente este objetivo, se realizó la caracterización molecular del crudo derramado CX a los diferenciales de tiempo. A continuación se presenta los diferentes análisis:

a.) Análisis de las fracciones SARA

En esta sección se presenta los cambios en la composición molecular observados en las diferentes fracciones del crudo CX una vez derramada durante un tiempo de quince (15) semanas para el año 2017 y un tiempo de doce (12) semanas para el año 2018. En la tabla 23, se muestran los porcentajes relativos de las cuatro (4) fracciones del crudo recolectado cada 3 semanas.

Tabla 23. Porcentajes relativos de las fracciones del crudo derramado (CX) (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

	(%)	**(%)**			
	Muestra	**Hidrocarburos saturados (±3)**	**Hidrocarburos aromáticos (±2)**	**Resinas (±4)**	**Asfalteno (±2)**
2017	**Semana 0**	56	24	11	9
	Semana 3	54	26	10	10
	Semana 6	40	27	23	10
	Semana 9	28	35	25	12
	Semana 12	24	34	28	13
	Semana 15	20	35	31	14
2018	**Semana 0**	55	23	11	11
	Semana 3	52	24	11	13
	Semana 6	42	25	19	15
	Semana 9	34	26	24	16
	Semana 12	28	27	27	17

En la figura 30, se presentan las variaciones en porcentajes relativas de las fracciones del crudo con respecto a los cambios en la concentración microbiana en función del tiempo, para el año 2017.

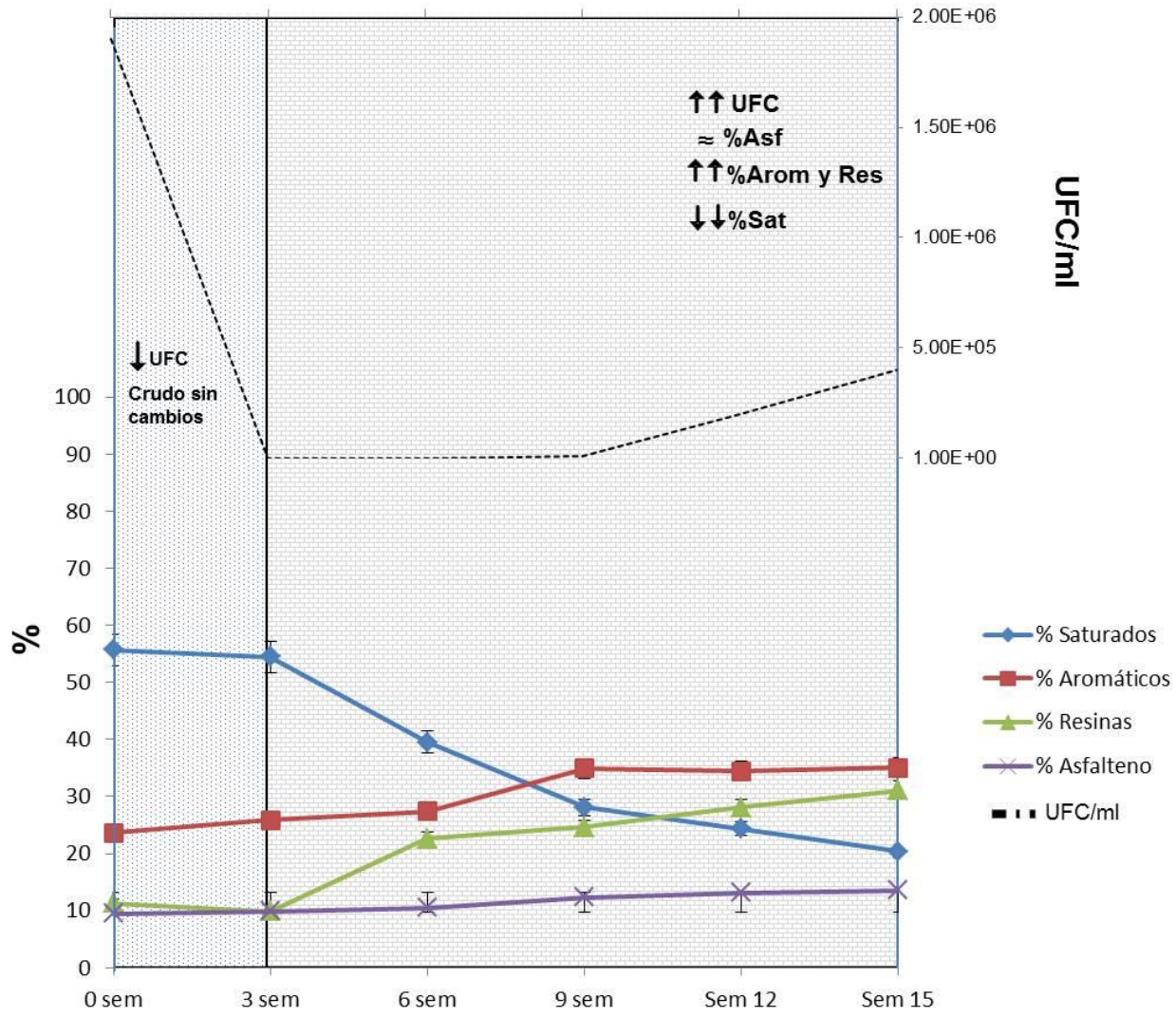

Figura 30. Variaciones en los porcentajes relativos de las fracciones del crudo con respecto a los cambios en la concentración microbiana en función del tiempo (año 2017) (Fuente: Elaboración Propia, 2017)

Durante el proceso de simulación de biodegradación, se observó que las diferentes fracciones de hidrocarburos son asimiladas metabólicamente a tasas de consumo variadas, esto como respuesta a las diferentes afinidades que presentan el consorcio bacteriano hacia los compuestos disponibles. En términos generales, dentro de las

cuatro (4) fracciones, la saturada, presenta cadenas de carbono más sencillas, siendo más fáciles de ser biodispuestas y metabolizadas por las bacterias.

Entre las semanas 0 y 3, ocurrió una disminución de la concentración bacteriana hasta de 3 órdenes de magnitud, pasando de 10^6 a 10^3 UFC/mL, lo que evidencia el proceso de selección natural, perdiéndose la gran diversidad bacteriana inicial a medida que se agotaban los nutrientes y comienza la adaptación para biodisponer al carbono del crudo como única fuente de alimento y energía. De manera que, el crudo no presentó cambios significativos en sus respectivas fracciones durante este tiempo, reflejando el efecto determinante de la actividad bacteriana sobre el crudo.

Durante las semanas 3 a la 9, se observó que las cepas comienzan a adaptarse (fase de adaptación), según Sihag y otros (2014), modifican su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (presencia de hidrocarburos como única fuente de alimento). Aunque no se aprecia un aumento en las concentraciones microbianas, hay una gran cantidad de carga metabólica, corroborándose esto, por la disminución de la fracción de saturados de 53% a 39%, ya que están siendo consumidas por las cepas que se están adaptando. En esta fase se forman las enzimas y los metabolitos intermedios hasta alcanzar las concentraciones necesarias para reiniciar el crecimiento.

Posteriormente, durante las últimas semanas, se identificó la fase de crecimiento exponencial (Martínez y otros, 2015), en esta etapa, las bacterias ya han adaptado una nueva configuración metabólica, permitiéndole utilizar el carbono del crudo como fuente principal alimenticia. La biomasa microbiana incrementa a una velocidad tan alta con respecto al tiempo. Este aumento acelera el proceso de biodisposición del carbono de las cadenas saturadas. Estas evidencias permiten garantizar que con la batería de experimentos planteada en esta investigación se logró simular condiciones efectivas del proceso de biodegradación en el crudo, ya que se obtuvieron las altas concentraciones bacteriológicas y pérdidas significativas de las cadenas de la fracción saturada del crudo.

En la fracción de asfaltenos, no se observaron variaciones aparentes, debido a su resistencia al proceso de degradación microbiana, esta fracción se conoce como

residuo recalcitrante o compuesto xenobiótico ya que son resistentes a la degradación por especies biológicos (Rojas y otros, 2003). Estos compuestos resistentes pueden dar como resultados compuestos más susceptibles a la degradación biológica en etapas muy avanzadas, ya que al adaptarse las cepas comienzan a incorporarlas a sus rutas metabólicas, pudiendo llegar a ser capaces de utilizarlas como fuente complementaria de alimento y energía (Alexander, 1999).

En la figura 31, se presenta la clasificación de las muestras de crudo original (semana 0) y cada diferencial de tiempo recolectadas durante las simulaciones (años 2017 y 2018), basada en su composición, para ello se empleó el diagrama ternario modificado de Tissot y Welte (1984

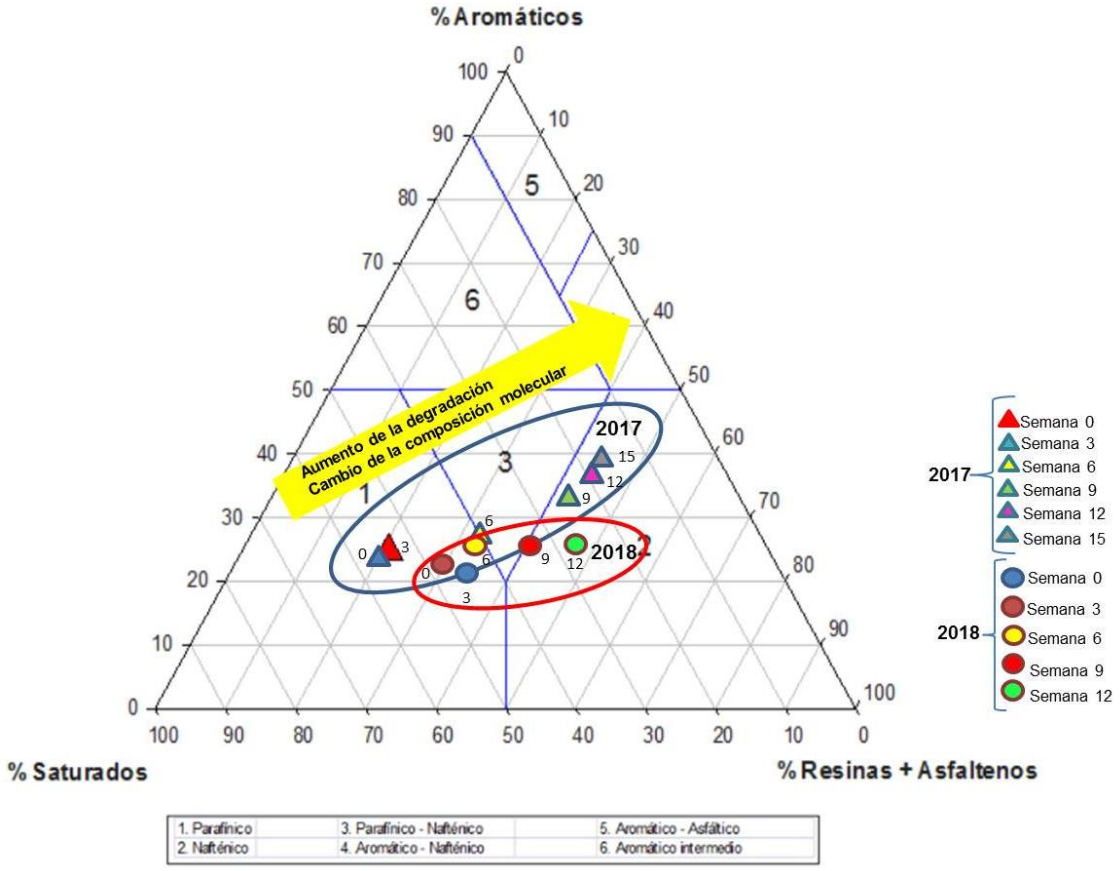

Figura 31. Clasificación de las muestras de crudo recolectadas durante las simulaciones (años 2017 y 2018) (Fuente: modificado de Tissot y Welte, 1984, p. 383)

Se aprecia que, las muestras de crudo de las semanas 0 y 3 (para ambos años), corresponden a un crudo parafínico, mientras que, los crudos de las semanas posteriores, pueden clasificarse como crudos nafténicos. Esto permite evidenciar, el cambio en la composición que ha sufrido el crudo al ser sometido al proceso de degradación biológica simulada con bioaumentación y bioestimulación. Permitiendo garantizar que el proceso de biodegradación planteado por el diseño factorial, rige las modificaciones encontradas en el crudo durante los diferenciales de tiempo.

El crudo original CX se puede clasificar como parafínico por su alto porcentaje de saturados, sin embargo, a medida que aumenta la exposición a la actividad microbiana, se aprecia el cambio en la composición molecular, convirtiéndose a un crudo con alto contenido de resinas y asfaltenos (nafténico). De manera, que, para los primeros estadios de meteorización pudiesen ser útiles; estas herramientas tienen limitaciones en crudos degradados con largos periodos de exposición.

b.) Análisis de hidrocarburos saturados C_{15}^{+} (Cromatografía de gases)

En la figura 32, se presenta la superposición de los cromatogramas obtenidos por la instrumental analítica de GC-FID, en los hidrocarburos saturados para el crudo original CX (semana 0) y el crudo de la semana 15. Se puede observar, a simple vista, la disminución de las cadenas alifáticas en el crudo, concordando con los resultados obtenidos en el análisis de SARA.

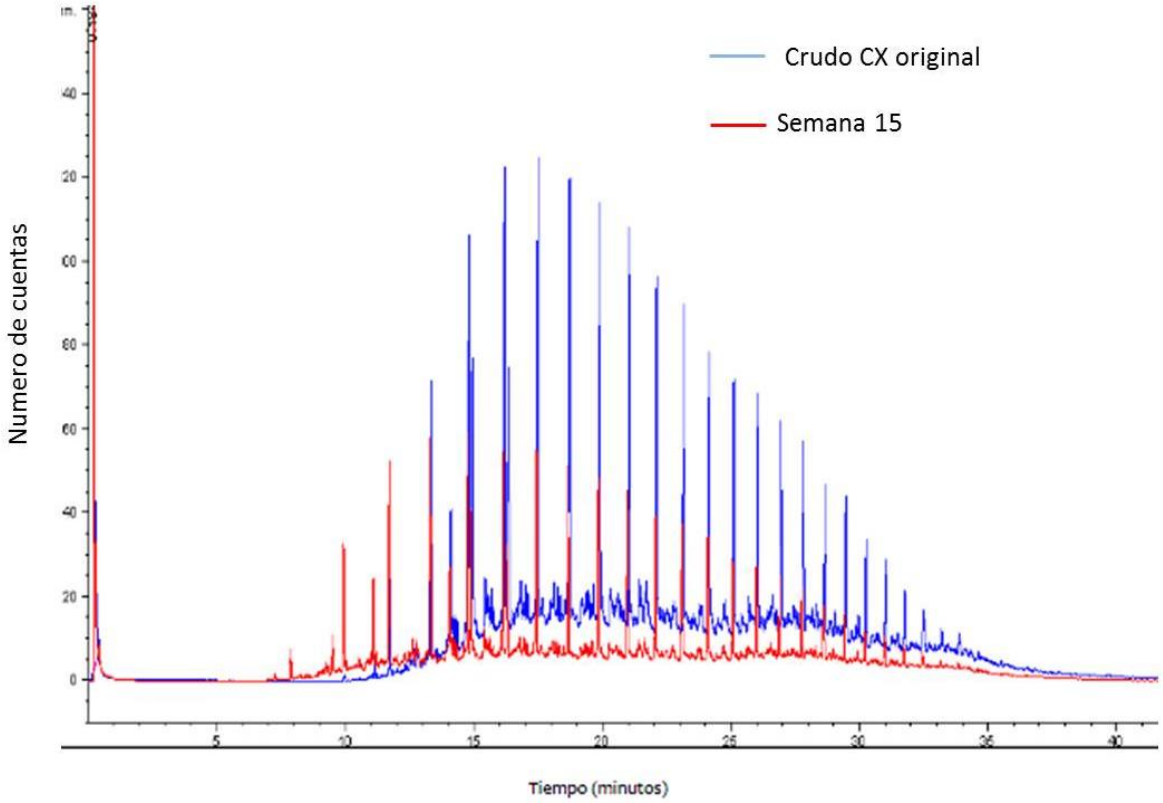

Figura 32. Superposición de los cromatogramas para las muestras de crudo semana 0 (crudo original CX) y la semana 15 de exposición a la biodegradación (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

Los resultados cuantitativos, se presentan en la figura 33, indican que, se producen disminuciones relativas de las cadenas alifáticas de menor peso molecular a diferentes grados de degradación en el rango de n-alcanos C_{11}-C_{15} durante las simulaciones controladas en el laboratorio. Mientras que, en los n-alcanos $>C_{15}$ no se observan disminuciones significativas después de 15 semanas de las simulaciones (degradación bacteriana).

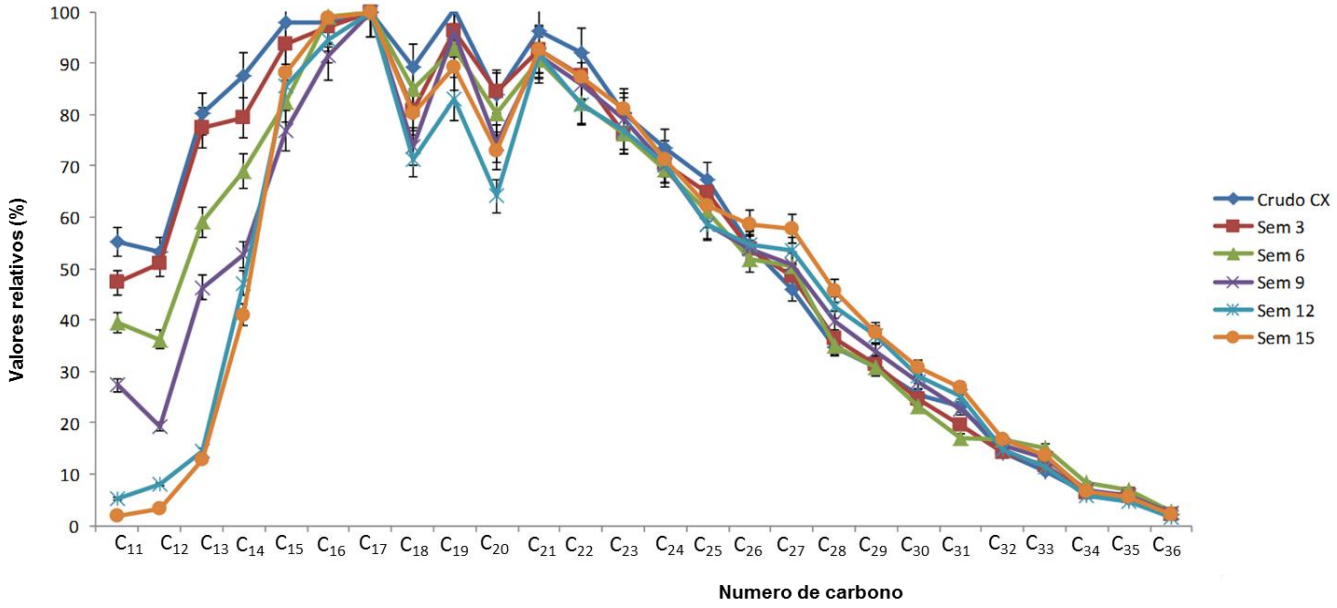

Figura 33. Valores relativos (%) de los n-alcanos individuales de los crudos recolectados durante las simulaciones (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

El perfil del análisis de C_{15}^{+} en hidrocarburos saturados, para los n-alcanos $>C_{18}$ pudiesen ser útiles para la identificación de posible fuente de crudos derramados que han sufrido biodegradación en un tiempo de 15 semanas, sin embargo en niveles mayores de exposición bacteriana pudiera presentar limitaciones para establecer posible origen de la fuente de derrame.

Los compuestos de bajo peso molecular (C_{11} a C_{15}) presentaron los mayores niveles de agotamiento o consumo (>3%). Mientras que, en los n-alcanos de mayor peso molecular ($>C_{15}$) se observan variaciones insignificantes, que van en el orden de 0,5‰ (que está dentro del error de la técnica analítica), permitiendo usarlo a los n-alcanos de mayor peso molecular como huella característica del crudo expuesto a actividad bacteriana.

c.) Biomarcadores alifáticos o saturados

Los biomarcadores o marcadores biológicos en la fracción de hidrocarburos alifáticos o saturados, son utilizados como indicadores del tipo de materia orgánica aportado a una cuenca, condiciones paleoambientales de sedimentación y madurez térmica de la roca fuente.

En la figura 34, se aprecia la distribución de n-alcanos y de los isoprenoides pristano (Pr) y fitano (F) obtenida por la técnica de cromatografía de gases para la fracción de saturados en el crudo CX (semana 0).

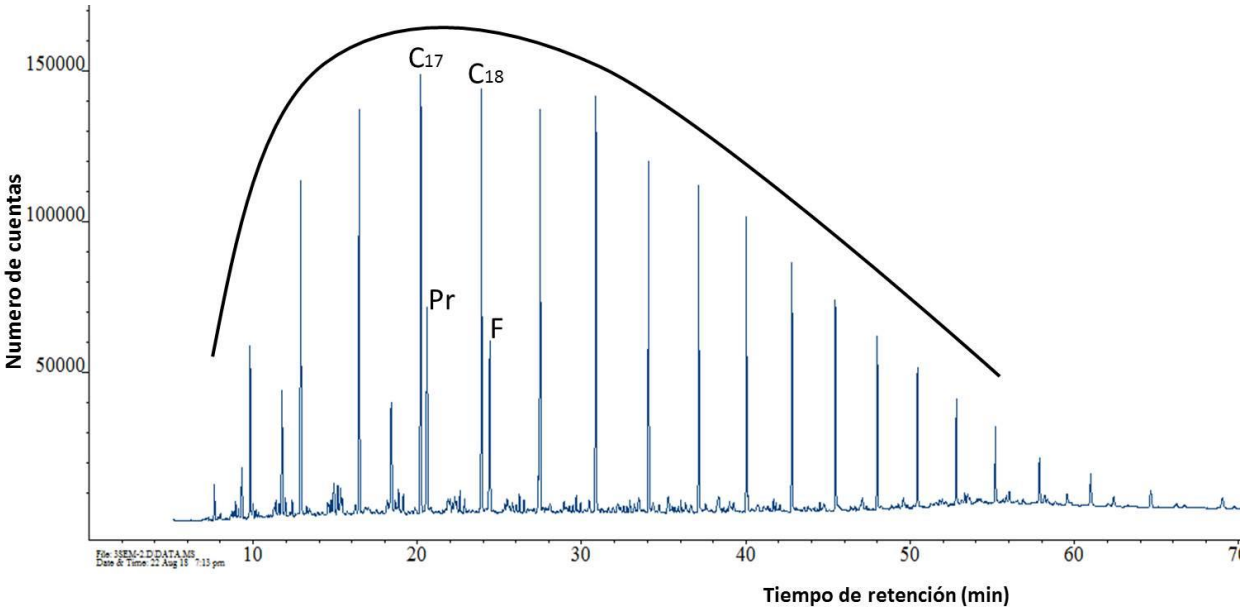

Figura 34. Distribución de n-alcanos y de los isoprenoides (Pr y F) en el crudo CX para la semana 0 de exposición bacteriana (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

De acuerdo al patrón de distribución de los n-alcanos e isoprenoides, la Geoquímica Orgánica, permite inferir el tipo de materia orgánica de origen, esto se basa en la abundancia relativa de los n-alcanos de baja masa molecular ($<C_{25}$) respecto a los de alta masa molecular ($>C_{25}$). En el caso del crudo empleado, CX, donde los máximos se observan sesgados a las cadenas de baja masa molecular indica que es de origen marino.

Los n-alcanos e isoprenoides, como compuestos ubicuos en crudos y productos refinados, han demostrado su utilidad para el establecimiento de huellas características en crudos que no han sufrido degradación en etapas avanzadas (Peter y Moldowan, 1993).

En la tabla 24, se presenta algunas relaciones empleadas para el diagnóstico de procesos de alteración, como la degradación bacteriana. Se utilizó el método de evaluación de índices sugerido por Li y otros (2009), donde se utiliza la desviación estándar relativa (% RSD, por sus siglas en ingles), la cual es considerada como un indicador para la variabilidad de los índices de diagnóstico en procesos de degradación. Los autores indican que índices con % RSD <5% probablemente no sean afectados por la degradación a corto plazo, mientras que un % RSD > 5% sugiere que la degradación tiene un efecto importante en el índice o parámetro.

Tabla 24. Variabilidad de parámetros geoquímicos de los crudos recolectados en las simulaciones (Fuente: Modificado de Li y otros, 2009, p. 116)

Relaciones	**Semana 0**	**Semana 3**	**Semana 6**	**Semana 9**	**Semana 12**	**Semana 15**	**Promedio**	**Desviación estándar**	**RSD %**
Pr/C_{17}	0,9	1,1	0,8	1,2	1,0	0,9	1,0	0,2	**16,1**
Ph/C_{18}	0,9	1,2	0,9	1,1	1,2	1,1	1,0	0,2	**15,4**
Pr/Ph	1,1	1,0	0,9	1,2	1,3	1,2	1,1	0,1	**11,3**
C_{24}/C_{34}	25,8	24,8	19,3	22,9	38,8	26,3	22,32	2,8	**12,6**
$\sum(C_{15}-C_{27})/\sum(C_{28}-C_{34})$	13,3	13,2	12,1	11,4	11,6	11,0	11,52	0,5	4,0

Los resultados presentados en la tabla 24, muestran que a excepción de $\sum(C_{15}-C_{27})/\sum(C_{28}-C_{38})$ (% RSD <5%), en las relaciones de Pr/C_{17}, Ph/C_{18}, Pr/Ph y C_{28}/C_{34}, se observan cambios evidentes en los crudos sometidos a alteración biológica, de manera

que estas relaciones permiten evidenciar la degradación bacteriano sobre el crudo durante el derrame simulado en esta investigación. Estas relaciones evidencian que las cadenas de carbono de más bajo peso molecular presentan cambios por la biodegradación, mientras que, en las cadenas más largas ($>C_{15}$) no presentan cambios aparentes ante la actividad microbiana.

López (2013), señala que durante la biodegradación de un crudo los n-alcanos son alterados antes de los isoprenoides, produciendo incremento en las relaciones de Pr/C_{17} y Ph/C_{18} (p. 45). Tal como se puede evidenciar en los parámetros de la tabla.

d.) Biomarcadores aromáticos

Los compuestos incluidos dentro de los biomarcadores aromáticos se originan por deshidrogenación de compuestos originales del crudo, que conduce a la aromatización y formación de nuevos compuestos.

- Esteranos monoaromáticos.

Son detectados en el fragmentograma m/z 253. En la figura 35, se observan los fragmentogramas para las muestras CX y semana 15.

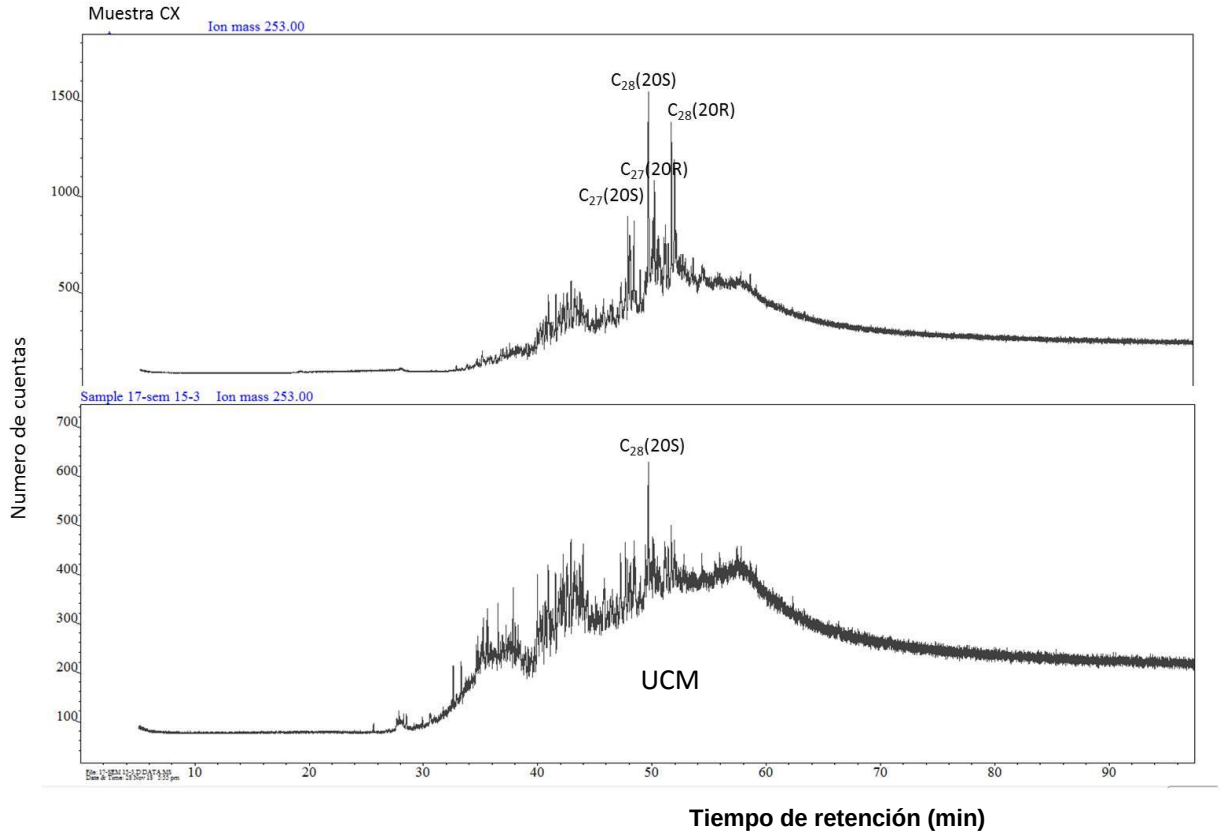

Figura 35. Fragmentograma m/z 253 para las muestras CX original y en la semana 15, donde se observan los esteranos monoaromáticos (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

En la figura, se puede observar claramente la pérdida de las esteranos monoaromáticos de 21 y 22 átomos (no identificables), así como los de 27, 28 y 29 átomos de carbono comparando entre el crudo original y la semana 15. El cromatograma de la semana 15, se hace difícil identificar los picos además que se observa un gran levantamiento del fondo conocido como UCM, evidenciando alteración en la composición molecular del crudo.

De acuerdo a López (2013), el orden de alteración microbial de los esteranos corresponde a C_{27}>C_{28}>C_{29}>C_{20}>C_{21}. Tal cual se puede apreciar en la figura 35, estos picos completamente alterados o ausentes.

- Esteranos triaromáticos.

Son detectados en el fragmentograma de m/z=231. La pérdida de esteranos triaromáticos de bajo peso molecular en proceso de biodegradación, es debido a la solubilidad de éstos, ya que, estos compuestos son de configuración biológica (20R), de manera que son susceptibles a la actividad microbiana. Tal como se puede apreciar en la figura 36.

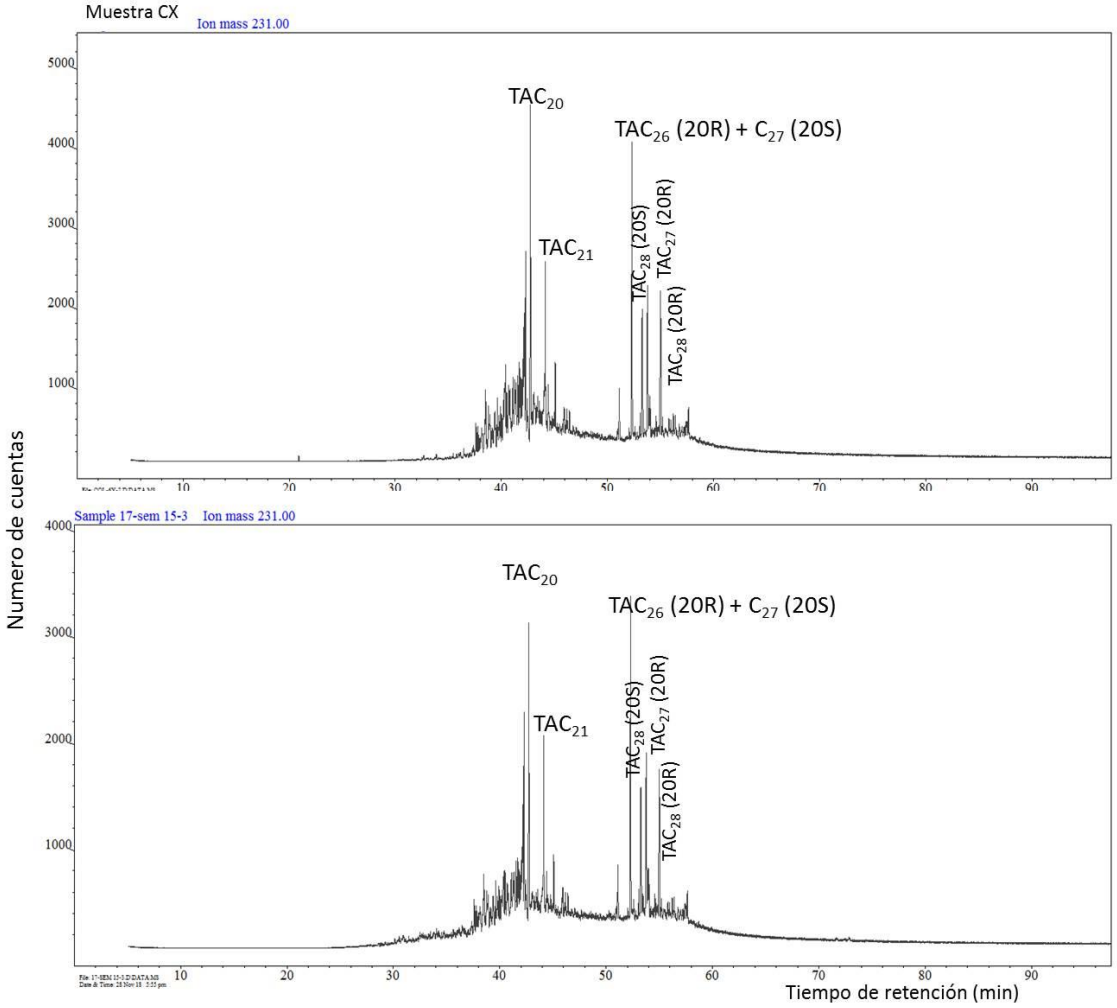

Figura 36. Fragmentograma m/z 231 para las muestras CX original y en la semana 15, donde se observan los esteranos triaromáticos (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

En la figura 36, se puede apreciar, que en el fragmentograma de la semana 15, una disminución leve de los esteranos triaromáticos de bajo peso molecular de 20 y 21, lo que, genera un aumento relativo en los compuestos de alto peso molecular. En la figura 37, se presenta el aumento relativo de las cadenas C_{26}, C_{27} y C_{28}, asociado al consumo del consorcio bacteriano de los esteranos de 20 y 21.

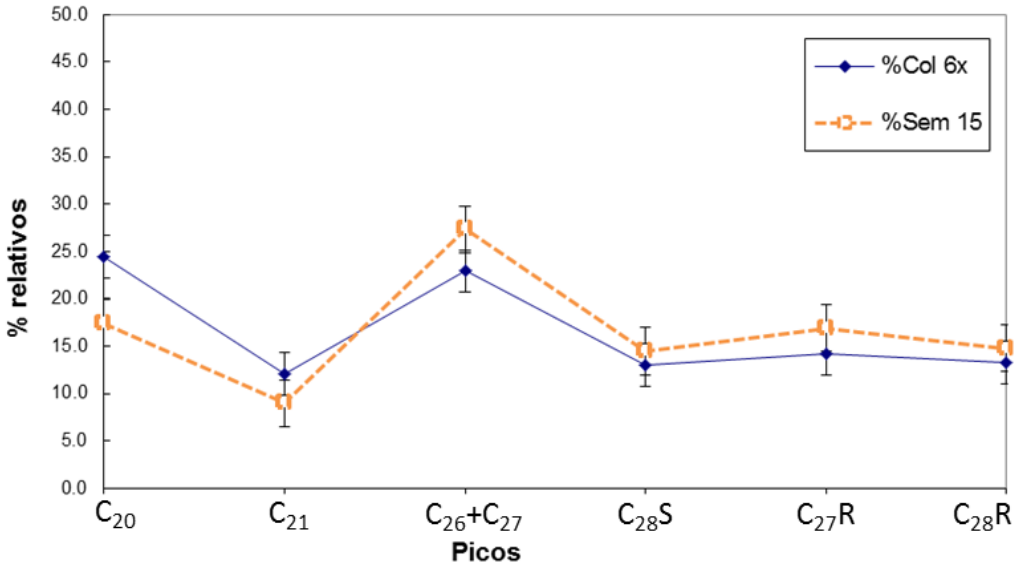

Figura 37. Aumento relativo de las cadenas C_{26}, C_{27} y C_{28}, asociado al consumo del consorcio bacteriano de los esteranos de 20 y 21 (Fuente: Elaboración propia, 2019)

De manera, que el empleo de estas herramientas geoquímicas en derrames petroleros deben ser utilizados con sumo cuidado para evitar interpretaciones erróneas, ya que presentan limitaciones en crudos degradados.

Objetivo 3. Evaluar las tendencias de los perfiles isotópicos del crudo, en función del tiempo de exposición, a la degradación microbiana

Para cumplir a cabalidad este objetivo, fue necesario realizar un gran número de medidas que permitieran dar aseguramiento de la calidad de los datos analíticos. De manera, que cada muestra fue analizada un total de 3 réplicas, además del patrón interno empleado por el laboratorio. Obteniéndose en total 360 valores isotópicos de carbono de los compuestos individuales de la fracción saturada (CSIA).

En la figura 38, se presenta los cromatogramas de las relaciones isotópicas (m/z = 44, 45 y 46) obtenidos a través de la técnica GC-IRMS. Se observan los cromatogramas de la fracción alifática para cada diferencial de tiempo de exposición a la degradación bacteriana.

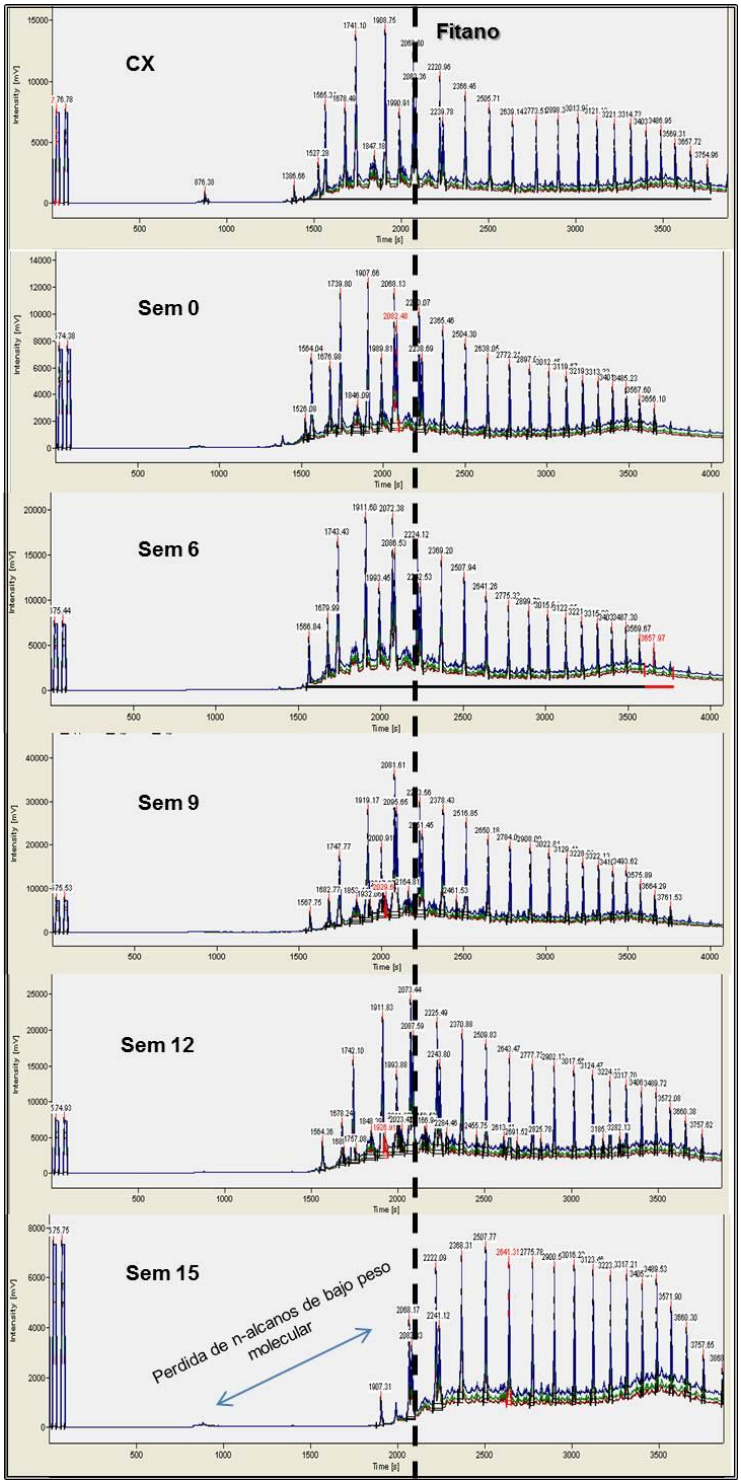

Figura 38. Cromatogramas para el crudo CX y a los diferenciales de tiempo de exposición a la actividad bacteriana, a través de la técnica GC-IRMS (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

En la figura 38, tal cual se evidenció con las herramientas de la Geoquímica Orgánica convencional, los cromatogramas obtenidos a través de la técnica de GC-IRMS, permite observar, que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la biodegradación (semana 15), se visualiza claramente la perdida de cadenas de carbono de bajo peso molecular ($<C_{15}$), además de la aparición del material de carbono irresoluble (UCM por sus siglas en ingles). Corroborándose las limitaciones que presentan las herramientas geoquímicas convencionales en estadios avanzados de biodegradación.

No obstante, en la tabla 25, se presentan los valores isotópicos de los CSIA de carbono en la fracción saturada del crudo CX y en las diferentes semanas de las simulaciones para los años 2017 y 2018, con sus respectivos promedios y desviaciones estándar.

Tabla 25. Valores isotópicos de los CSIA de carbono en la fracción saturada del crudo CX y en diferenciales de capacidad de tanqueros, con sus respectivos números promedios y desviaciones estándar (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)						
Numero de carbono	**crudo CX**	**Sem 0**	**Sem 6**	**Sem 9**	**Sem 12**	**Sem 15**
C_{15}	-27.4	-29.2	-28.3	-28.6	-27.4	
C_{16}	-28.0	-28.4	-29.0	-29.2	-27.5	
C_{17}	-27.7	-28.1	-28.2	-28.5	-27.3	-29.5
Pr	-28.9	-31.5	-30.4	-29.5	-28.4	-29.6
C_{18}	-28.0	-28.6	-28.4	-27.9	-27.8	-29.4
F	-29.7	-28.3	-30.5	-30.5	-28.6	-30.3
C_{19}	-29.7	-29.2	-29.1	-29.3	-29.9	-29.7
C_{20}	-29.8	-28.9	-29.8	-30.2	-29.4	-29.6
C_{21}	-30.2	-29.3	-30.6	-30.6	-30.0	-29.7
C_{22}	-30.9	-29.5	-29.8	-30.3	-31.2	-29.7
C_{23}	-30.6	-29.5	-30.2	-30.6	-31.2	-29.9
C_{24}	-30.5	-28.1	-29.6	-30.7	-31.1	-30.6
C_{25}	-30.5	-30.2	-30.6	-30.7	-31.2	-30.6
C_{26}	-30.2	-29.5	-29.5	-30.4	-30.7	-30.4
C_{27}	-30.7	-28.7	-30.0	-30.1	-31.2	-30.2
C_{28}	-30.2	-28.7	-30.2	-30.0	-29.6	-30.7
C_{29}	-31.1	-29.3	-31.0	-31.2	-31.1	-31.1
C_{30}	-32.4	-30.7	-32.3	-32.2	-32.1	-31.1
C_{31}	-31.6	-32.7	-30.9	-31.7	-31.8	-31.7
C_{32}	-33.5		-32.7	-33.3	-33.1	-32.6

En la figura 39, se presentan gráficamente, los perfiles isotópicos obtenidos durante los diferenciales de tiempo de exposición de actividad bacteriana.

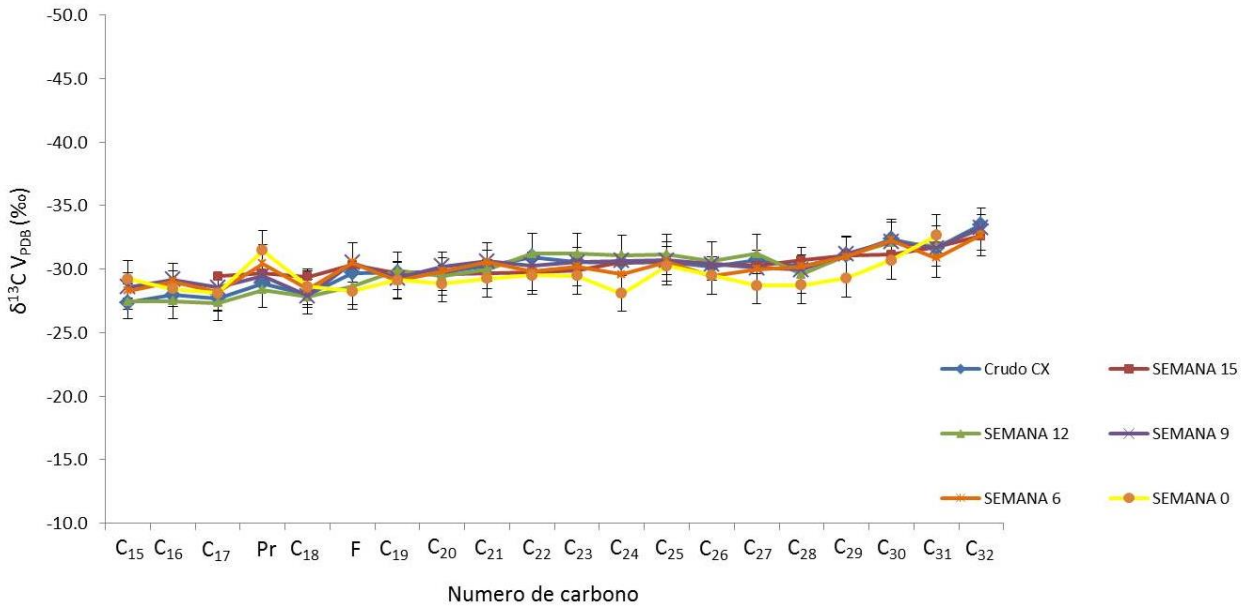

Figura 39. Tendencias isotópicas obtenidas durante los diferenciales de tiempo de exposición de actividad bacteriana (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

En la figura 39, se aprecia la existencia de un patrón bien definido de distribución de la composición isotópica de compuestos específicos de n-alcanos (CSIA), en las diferentes muestras del crudo CX degradado a diferenciales de tiempo desde C_{15} hasta C_{32}, observándose cambios insignificantes dentro de cada valor (se aprecian dentro del error analítico ±0,5‰).

Los resultados obtenidos permiten indicar que el proceso de degradación bacteriana, que es considerado en la bibliografía, como el proceso que causa cambios permanentes en la composición molecular en los hidrocarburos, no tiene efecto significativo en las relaciones isotópicas de carbono en la fracción alifática. Lo que hace inferir que, los CSIA en la fracción saturada son resistentes, es decir, no se modifican las relaciones isotópicas ante los efectos de la biodegradación. Permitiendo establecerla como una herramienta forense ambiental para determinar la correlación entre el origen de la contaminación y el crudo derramado.

Adicionalmente, aunque no es objeto de esta investigación, desde el punto de vista de la geoquímica isotópica, la tendencia “plana”, en forma de plato, permite evidenciar el origen de la materia orgánica precursora, la cual es de origen marino.

Objetivo 4. Comparar las tendencias de los perfiles isotópicos de crudos, en función del tipo de crudo exportable venezolano con respecto a otros países

Para lograr el cumplimiento de este objetivo se compararon el perfil isotópico de los compuestos individuales de carbono de la fracción saturada del crudo CX (venezolano) con crudos encontrados en la bibliografía. En la tabla 26, se presentan los valores isotópicos de los CSIA de carbono para Venezuela, China, Australia y Venezuela.

Tabla 26. Valores isotópicos de los CSIA de carbono para Venezuela, China, Australia y Colombia (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) ±0,5				
Numero de carbono	**Venezuela (crudo CX)**	**China (Li y otros, 2009, p.116)**	**Australia (Dawson, 2007, p. 1023)**	**Colombia (Cortes y otros, 2010, p. 207)**
C_{15}	-28.2	-29.2	-27.5	-26.2
C_{16}	-28.4	-29.5	-27.0	-28.2
C_{17}	-28.0	-29.5	-26.9	-23.7
Pr	-29.7	-29.7	-26.7	-26.4
C_{18}	-28.2	-29.9	-26.6	-29.8
F	-29.5	-	-26.6	-26.1
C_{19}	-29.4	-30.5	-26.6	-27.0
C_{20}	-29.6	-31.0	-26.6	-27.3
C_{21}	-30.1	-31.1	-26.4	-27.3
C_{22}	-30.4	-31.3	-26.2	-26.0
C_{23}	-30.4	-31.5	-26.2	-27.7
C_{24}	-30.0	-30.0	-26.2	-26.9
C_{25}	-30.6	-29.6	-26.2	-27.6
C_{26}	-30.0	-29.5	-26.1	-30.0
C_{27}	-30.1	-29.0	-26.5	-27.5
C_{28}	-29.7	-29.0	-27.0	-26.9
C_{29}	-30.7	-29.2	-27.5	-32.1
C_{30}	-31.9	-29.3	-27.5	-28.1
C_{31}	-31.7	-29.3	-27.5	-26.8
C_{32}	-33.1	-29.0	-28.0	-26.3

En la figura 40, se puede observar las tendencias isotópicas de Venezuela, China, Australia y Colombia. Es importante resaltar, que en este caso, para hacer más practica

la comprensión de la herramienta, se utilizaron los promedios de los valores isotópicos obtenidos en este trabajo para cada crudo.

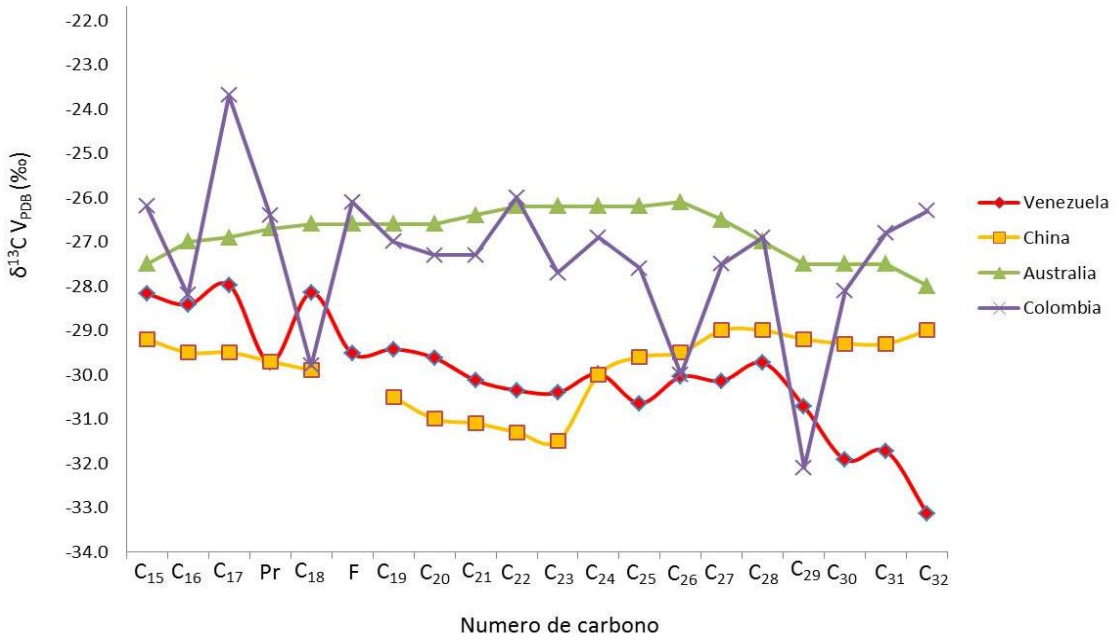

Figura 40. Perfiles isotópicos de los CSIA de la fracción saturada para Venezuela, China, Australia y Colombia (Fuente: Elaboración Propia, 2018)

Se puede observar, que el crudo venezolano CX, se diferencia claramente de los otros crudos. Todos los crudos presentan una tendencia o perfiles isotópicos bien diferenciados (huella característica) desde C_{15} hasta C_{32}. Y cada perfil isotópico está definido por la materia orgánica que dio origen a cada crudo, por eso son únicos para cada uno. Esto permite evidenciar que, en caso de establecer responsabilidades ambientales en posibles demandas internacionales, se puede emplear una herramienta como los CSIA para distinguir de manera precisa y confiable, el crudo venezolano de otros crudos.

Objetivo 5. Plantear un procedimiento general para la aplicabilidad de la herramienta forense de los CSIA en caso de derrames petroleros venezolanos en sistemas marinos.

Como se esbozó durante este documento, las rutas marítimas de las embarcaciones petroleras son altamente transitadas, ya que las empresas exportadoras transportan en gran volumen una gran variedad de combustibles líquidos aumentando la probabilidad de derrames con consecuencias fatales. Lo que hace necesario tener herramientas analíticas como la de los CSIA en casos de establecer fuente de manera confiable.

La fortaleza de las relaciones isotópicas a través de los CSIA como herramienta forense ambiental está en su capacidad de correlacionar entre las muestras de la fuente de contaminante y las del material derramado, inclusive si éstas se encuentran altamente biodegradadas. En esta investigación, se corroboró, la utilidad de la herramienta de CSIA en las ciencias forenses ambientales, ya que se pudo comprobar la confiabilidad y precisión de los datos analíticos obtenidos, que la propiedad refractaria medida (relaciones isotópicas) son inalterables a los procesos de alteración del ambiente (en el caso de esta investigación se enfocó en la degradación bacteriana) y además de la practicidad en la interpretación de los perfiles o tendencias isotópicas.

A continuación, se desglosa el procedimiento general que se debería realizar para la aplicación de la herramienta una vez ocurrido el derrame: es importante señalar, que todo esto es posible siempre y cuando se exija que todas las embarcaciones de la empresa petrolera nacional, tenga un certificado obligatorio del perfil isotópico (CSIA) de la carga de hidrocarburos que transporta:

1.) Recolectar muestras representativas del hidrocarburo derramado a lo largo del área afectada y de las del hidrocarburo venezolano con calidad de exportación original (el que salio del puerto de carga). Las mismas deben estar debidamente rotuladas e identificadas.

2.) Enviar las mismas al laboratorio y solicitar el análisis de Geoquímica Orgánica convencional: SARA, fracción C15+, biomarcadores saturados y aromáticos.

3.) Posteriormente, realizar el análisis de los compuestos específicos de carbono (CSIA) en la fracción saturada.

4.) Finalmente, realizar la comparación entre el perfil isotópico de la potencial fuente del derrame y el hidrocarburo derramado.

Como cada perfil isotópico está definido por la materia orgánica que dio origen a cada crudo, dichas tendencias son únicas para cada crudo y pueden ser empleadas para correlacionar crudos del mismo origen. De manera que, los análisis de Geoquímica Orgánica convencional y los de CSIA permitirán establecer el tiempo relativo o estimado de exposición a la intemperización y la fuente del contaminante.

5. CONCLUSIONES

- Se alcanzaron las condiciones óptimas experimentales que garantizaron la biodegradación extrema en las simulaciones de derrame de crudo en medio marino, las cuales consistieron en la bioaumentación y bioestimulación, además de la acertada elección entre las aguas recolectadas (costa afuera), lo que permitió obtener concentraciones bacteriológicas en el orden de 10^6 UFC/mL y cambios significativos en el crudo derramado.

- Los resultados obtenidos con los parámetros geoquímicos convencionales: SARA, C_{15}^{+}, biomarcadores saturados y aromáticos, permiten evidenciar los cambios en la composición molecular del crudo producto de la actividad bacteriana. Aunque son herramientas útiles para correlación crudo – fuente, deben ser empleados con sumo cuidado porque presentan limitaciones en su aplicación para crudos degradados.

- En cuanto a los CSIA, los resultados obtenidos permiten indicar que el proceso de degradación bacteriana, no tiene efecto significativo en las relaciones isotópicas de carbono en la fracción alifática o saturada. Los cambios en la composición molecular observados dependen del tipo de materia orgánica que dio origen al crudo y de los procesos de alteración a los que son sometidos.

- En la medición de la relación isotópica (propiedad refractaria), se observa que sus valores no sufren variaciones significativas, específicamente los CSIA en la fracción saturada son inalterables durante el proceso de biodegradación, estableciéndola como una herramienta forense útil para la correlación entre la fuente de la contaminación y el crudo derramado en medio marino, independiente del tiempo de exposición a la actividad bacteriana.

6. RECOMENDACIONES

A continuación, como resultado de la investigación realizada, se formulan una serie de recomendaciones, a fin de contribuir en investigaciones futuras:

- Ampliar las simulaciones de derrames petroleros marinos, en cuanto a los diferenciales de tiempo, para evaluar los demás factores dentro de la meteorización marina (foto oxidación, emulsificación, dispersión, enriquecimiento de ceras y disolución) y los cambios en la composición molecular del crudo en estadios más avanzados de este proceso de alteración.
- Emplear herramientas analíticas como: IR y análisis químico elemental, como análisis complementarios que permitan afinar la comprensión de las posibles rutas metabólicas preferenciales del consorcio bacteriano y del proceso de degradación biológica.
- Realizar la identificación fenotípica de las cepas resilientes en este trabajo a través del empleo de la Microbiología Marina.
- Realizar la aplicación de la técnica analítica CSIA en casos reales para consolidar su utilidad.
- Establecer el análisis de compuestos específicos de la fracción saturada (CSIA) como un parámetro regular y obligatorio dentro del “Certificado de salida” de los crudos venezolanos con calidad de exportación.
- Continuar incentivando la integración de diferentes disciplinas del saber científico para fortalecer la interpretación relacionada con el área de la Geoquímica Forense.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acevedo, S. (2001). Peso molecular, solubilidad y propiedades coloidales de los asfaltenos. Revista de la Sociedad Venezolana de Química, 24, 33-43.

Alberdi, M., Toro, C. y Maguregui, J. (1995). Técnicas geoquímicas para la caracterización de crudos en los yacimientos. Informe Técnico, PDVSA-Intevep, pp. 57.

Alexander, M. (1999). Biodegradation and bioremediation, segunda edición. Academic Press, Reino Unido.

Arias, F. (2006). El proyecto de investigación: Introducción a la metodología científica, 5 Edic., Editorial Episteme, pp.143.

Barakat, A., Mostafa, a., Rullkotter, J. y Rahman, A. (1999). Application of a multimolecular marker approaches to fingerprint petroleum pollution in the marine environment, Marine Pollution Bulletin, volumen 38, p. 535–544.

Bayona, J., Domínguez, C. y Albaigés, J. (2015). Analytical developments for oil spill fingerprinting. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 5, 26-34.

Bejarano, A. y Michel, J. (2013). Large-scale risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in shoreline sediments from Saudi Arabia: Environmental legacy after twelve years of the Gulf war oil spill. *Environmental Poluttion*, 158, 1561-1569.

Bence, A., Kvenvolden, K. y Kennicutt, M. (1996). Organic geochemistry applied to environmental assessments of Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill — a review, Organic Geochemistry, volumen 24, p. 7-42.

Benson, S., Lennard, C., Maynard, P. y Roux, C. (2012). Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry—A review. *Forensic Science International,* 157, 1-22.

Bjorøy, M. y Hall, K. (1991). Carbon isotope variations in n-alkanes and isoprenoides of whole oils. *Chemical Geology*, 93, 13-20.

Blomberg, J., Riemersma, T., Van Zuijlen, M. y Chaabani, H. (2004). Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with fast sulphurchemiluminescence detection: Implications of detector electronics, Journal Chromatography, volumen 1050, p. 77–84.

Borges del Castillo, J. (1967). The taxonomic distribution of some hydrocarbons in gymnosperms. *Phytochemistry*, 6, 391-398.

Castillo, E., Rivas, C., Murillo, M. y Abreu, J. (2011). Evaluación de la calidad microbiológica de la zona marino costera adyacente a la planta de distribución Carenero. Nota técnica: Confidencial NTE-1065,2011, PDVSA Intevep, 1-21.

Celis, J. (2009). Efectos de los derrames petroleros sobre los hábitats marinos. *Ciencia Ahora*, 24, 22-30.

Clayton, C. y BjorØy, M. (1994). Effect of maturity on $^{13}C/^{12}C$ ratios of individual compounds in North Sea oils. *Organic Geochemistry*, 21, 737-750.

Colegio de Ingenieros (1996). Código de Ética. Modificado por la Asamblea Nacional de Representantes del Colegio.

Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo (1992). Declaración de Rio sobre el medio ambiente y el desarrollo, 1-5.

Cortes, J., Rincón, J., Jaramillo, J. Paul Philp, R. y Allen, J. (2010). Biomarkers and compound-specific stable carbon isotope of n-alkanes in crude oils from Eastern Llanos Basin, Colombia. *Journal of South American Earth Sciences*, 29,198-213.

Curiales, J. (2008). Oil-source rock correlations – Limitations and recommendations. *Organic Geochemistry*, 39, 1150-1161.

Dawson, D., Grice, K., Alexander, R., Edwards, D. (2007). The effect of source and maturity on the stable isotopic compositions of individual hydrocarbons in sediments and crude oils from the Vulcan Sub-basin, Timor Sea, Northern Australia, Organic Geochemistry, volume 38, p. 1015 – 1038.

Didyk, B., Simoneit, B., Brassell, S. y Eglinton, G. (1978). Organic geochemistry indicator of paleoenvironmental conditions of sedimentation. *Nature*, 272, 216-222.

Echarri, J. (2005), Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente, Editorial Teide, Madrid, pp. 120.

Engel, M. y Macko, S. (1993). Organic Geochemistry: Principles and Applications, Plenum Press, pp. 861.

Gaines, R., Frysinger, G., Reddy, C. y Nelson, R. (1999). Oil spill source identification by comprehensive two-dimensional gas chromatography Environmental Science Technology, volumen 33, p. 2106–2112.

Guthrie, J. (1996). Molecular and carbon isotopic analysis of individual biological markers: evidence for sources of organic matter and paleoenvironmental conditions in the Upper Ordovician Maquoketa Group, Illinois Basin, U.S.A., Organic Geochemistry, volumen 25, p. 439 – 460.

Haddad, R. (2010). *Invited Editorial: What is environmental forensics?*, Environmental Forensics, vol. 5, 3 p.

Hayes, J. (2002). Isotopic compositions and probable origins of organic molecules in the Eocene Messel Shale. *Nature*, 329, 48-51.

Hoefs, J. (2009). Stable Isotope Geochemistry. 6 Edic. Springer, Alemania, pp. 285.

Hostettler, F., Rosenbauer, R., Lorenson, T. y Dougherty, J. (2004). Geochemical characterization of tarballs on beaches along the California coast. Part I — Shallow seepage impacting the Santa Barbara Channel Islands, Santa Cruz, Santa Rosa, and San Miguel, Organic Geochemistry, volumen 35, p. 725–746.

Hough, R., Whittaker, M., Fallick, A., Preston, T., Farmer, J. y Pollard, S. (2011). Identifying source correlation parameters for hydrocarbon wastes using compound-specific isotope analysis. *Environmental Pollution*, 143, 489-498.

International Tankers Oil pollution Fund - ITOF (2015). [Página en línea]. Disponible en: http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/ [Consulta: 2017, febrero].

International Standard Organization (1999). 6222 Water quality -- Enumeration of culturable micro-organisms -- Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium, p. 4.

International Standard Organization (2005). 8199 Water quality -- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture, p.12.

International Standard Organization (2005). 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, pp.15.

Killops, S. y Killops, V. (2005). Introduction to Organic Geochemistry, Blackwell Publishing, USA, pp. 393.

Ley de Derechos de autor (1993). Gaceta Oficial N° 4.638 Extraordinaria, p.40.

LI, Y., Xiong, Y., Yang, W., Xie, Y. (2009). Compound-specific stable carbon isotopic composition of petroleum hydrocarbons as a tool for tracing the source of oil spills, Marine Pollution Bulletin, vol. 58, 114-117.

Lira-Galeana, C. y Hammami, A. (2000). Wax precipitation from petroleum fluids, *Developments in Petroleum Science*, 40, 557- 605.

López, L. (2013). Biomarcadores: Aplicaciones en la Geoquímica del Petróleo. 1era Edic., Universidad Central de Venezuela, Ediciones de la Biblioteca, pp. 120.

Madigan, M., Martinkon, J., Parker, J. (2004). Biología de los Microorganismos. 9ª edición. Pearson Educación, p. 120.

Martinez, J., Jimenez, M., Soto, D., Lomas, D. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarboclásticas degradadoras de gasolina. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias, vol. 12, Nº 2, 155-161.

Mazeas, L., Budzinski, H. y Raymond, N. (2008). Absence of stable carbon isotope fractionation of saturated and polycyclic aromatic hydrocarbons during aerobic bacterial biodegradation. Organic Geochemistry, 33, 1259-1272.

Michel, J., Wolfe, D., Payne, J., Galt, J. (1999). The fate of the oil spilled from the Exxon Valdez. Environmental Science Technology; volumen 28, p. 561–568.

Murphy, B. (2006) Environmental Forensics, Contaminant Specific Guide; Academic Press, Boston, pp. 465–531.

Murphy, B. y Morrison, R. (2002). Chemical fingerprinting of hydrocarbons. Introduction to Environmental Forensics; Academic Press, Boston, p. 137–260.

Peters, K., Walters, C. y Moldowan, J. (2005). The biomarker guide. Biomarkers and isotopes in the environmental and human history. Volumen 2, Cambridge University Press, pp. 471.

Peters, K. y Moldowan, M. (1993). The biomarker guide: Interpreting molecular fossil in petroleum and ancient sediments. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 363 p.

Philp, R., Allen, J. y Kuder, T. (2002). The use of the isotopic composition of individual compounds for correlating spilled oils and refined products in the environment with suspected sources, Environmental Forensics, volumen 3, p. 341-348.

Pisos, E. (2011). *El Régimen de Responsabilidad en Materia Marítima.* Ponencia presentada en el VII Congreso de Derecho Marítimo. Universidad Santa María, Caracas.

Prince, R., Garrett, R., Bare, R., Grossman, M. Townsend, T. y Suflita, J. (2003). The roles of photo oxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils. Spill Science Technology Bulletin, volumen 8, p. 145–156.

Raia, J Blakley, C., Fuex, A. (2008). *Evaluation of environmental samples components in environmental forensic investigations*. Environmental Forensics, vol. 5, 21-32.

Reddy, C., Eglinton, T., White, H., Xu, L. (2002). The West Falmouth oil spill after thirty years: The persistence of petroleum hydrocarbons in marsh sediments, Environmental Science Technology, volumen 36, p. 4754–4760.

Rivas, D. (2013). Desarrollo metodológico para los análisis isotópicos de los compuestos específicos (CSIA) en la fracción saturada C_{15}^{+} de los crudos, PDVSA-Intevep, p. 13.

Rojas, D., Di Toro, S., Fava, F. (2003). Levels of polyclorinated biphenyls in Mexican soils and their biodegradation by bioaugmentation. Bulletin of Toxicology and contamination, vol. 70, 63-70.

Royo y Gómez, J. (1974). Introducción a las Ciencias Geológicas, Ministerio de Educación, Venezuela, pp.464.

Sampieri, R., Fernández-Collado, C. y Baptista, P. (2006). Metodología de la Investigación, 4 Edic., Mc Graw Hill, México, pp. 850.

Sihag, S., Pathak, H., Jaroli, D. (2014). Factors affecting the ratio of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. International Journal of pure & applied bioscience, vol. 12, Nº 3, 185-202.

Skoog, D., Holler, F. y Nieman, T. (2001). Principios de análisis instrumental, 4 Edic., McGraw Hill, México, pp.1020.

Stainforth, J. (2009). Practical kinetic modeling of petroleum generation and expulsion. Marine and Petroleum Geology. Volume 26, p. 552-572, 2009.

Stout, S. (2009). Identifying the source of mystery waterborne oil spills — a case for quantitative chemical fingerprinting. Environmental Claims Journal, volumen 17, p. 71–88.

Sun, Y. (2005). Stable carbon and hydrogen isotopic fractionation of individual n-alkanes accompanying biodegradation: evidence from a group of progressively biodegraded oils. Organic Geochemistry, Volume 36, p. 225-238.

Tissot, B. y Welte, D. (1984). Petroleum Formation and Ocurrence. Springler-Verlag, New York. 2 Edic., pp. 699.

U.S. Energy Information Administration – EIA (2016). [Página en línea]. Disponible en: http://www.eia.gov/petroleum/ [Consulta: 2017, febrero].

Wang, Y., Huang, Y., Huckins, J., Petty, J. (2007). *Compound-specific carbon and hydrogen isotope analysis of sub-parts per billion level waterborne petroleum hydrocarbons.* Environmental Science and Technology, vol. 38, 3689–3697.

Wang, M. Wang, C. y He, S. (2015). Source Identification of Oil Spills Using Compound-Specific Carbon Isotope Analysis Based on “7-16” Oil Spill in Dalian, China. *Aquatic Procedia,* 3, 197-202.

Wilhelms, A. y Larter, S. (1994). Origin of tar mats in petroleum reservoirs. Part II: formation mechanisms for tar mats. *Marine and Petroleum Geology*, 11, 442 - 456.

Yen, T. (2000). The realms and definitions of asphaltenes. Asphaltenes and asphalts. *Developments in Petroleum Science*, 40, 7- 27.

Zamora, A., Ramos, J. y Arias, A. (2012). Efectos de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, 24, 5-12.

Zhendi, w. y Stout, S. (2007). Oil spill environmental forensics. Elsevier, Reino Unido, pp. 536.